

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Biotecnología

00591
11

293190

**“Análisis de la estructura y el procesamiento proteolítico de la
toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*”**

T E S I S

**que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Bioquímicas
presenta**

Biol. Raúl Miranda Caso Luengo

Cuernavaca, Morelos

Junio de 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Alejandra Bravo de la Parra. Para ello se contó con el apoyo económico de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 90282), así como de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM a través del Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP).

Agradecimientos

A la Dra. Alejandra Bravo porque ha sido un pilar en mi formación académica. Además de la enseñanza, agradezco su confianza y apoyo.

A los miembros de mi Comité Tutorial: Dra. Alejandra Bravo, Dr. Alberto Darszon y Dr. Arturo Hernández, por el seguimiento de este trabajo y de mi formación. Agradezco su enseñanza, discusión y crítica que siempre me conmino a la superación.

A los miembros del Jurado de examen: Dr. Lourival D. Possani, Dra. Alejandra Bravo, Dr. Felix Recillas, Dra. Gloria Saab, Dr. Jorge E. Ibarra, Dr. Takuya Nishigaki y Dr. Edmundo Calva, por la revisión crítica y por todos y cada uno de sus comentarios que indiscutiblemente enriquecieron a este trabajo.

Al Dr. Mario Soberón por su constante participación crítica.

A mis compañeros de los laboratorios de A. Bravo y M. Soberón porque todos ellos son o han sido parte de este barco en el que estamos navegando. Particularmente agradezco a Jorge, Maru, Mauricio, Gina, Lupe y Argelia.

A mis padres: Guadalupe y Raúl, a mis hermanos: Araceli, Alfonso y Adriana y a mis sobrinos: Aldo y Pablo (Que estará llegando por las mismas fechas en que yo obtengo este grado), a mis abuelas: Toña y Lupe, A mis tíos y primos. A todos ustedes por ser parte fundamental en mi vida, por su desinteresado apoyo y enseñanza, por su alegría de vivir.

A Tere porque durante muchos años fue mi compañera y su presencia, su consejo y su crítica me han llevado a esforzarme para superarme. Siempre tendrá un lugar importante en mi corazón.

A mis amigos: Martín, Alfredo, Aristides III y El Gabo porque ellos siempre han tratado de comprenderme y seguramente muchas veces han sido muy pacientes conmigo. A Martín y Alfredo les agradezco particularmente sus enseñanzas.

A Jalil, porque ha sido un gran maestro para mi y porque siempre es grato conversar con tan distinguido y culto personaje.

A mis amigos Rodrigo, David, Louis, Juan, Tak, El vampiro, Josué, porque ha sido muy grata la convivencia y la conversación que he tenido con ustedes.

A Ricardo y Shirley que junto con Jalil departieron conmigo la mesa tantas veces y llenaron de encanto la hora de la comida.

A los Sideróforos, porque me han enseñado a pertenecer a un equipo y me han dado la confianza necesaria para saber que siempre uno puede superarse.

A mis todos mis profesores, porque han sido parte fundamental de mi formación y desarrollo. Destaco a algunos que han tenido una particular significancia en mi vida: José Luis Gama, Sergio Vaca, Luis Miguel Salgado, Paul M. Lizardi y Alejandra Bravo.

A todos los que comparten o compartieron algún momento de sus vidas conmigo.

A todos Gracias

Indice

Indice	2
Indice de figuras	4
Indice de tablas	5
Abreviaturas	6
1. Resumen	7
1.a. Summary	8
2. Introducción	9
2.1. Generalidades de <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
2.2. Clasificación de las toxinas Cry	11
2.3. Mecanismo de acción	14
2.4. Estructura de las toxinas Cry	17
3. Objetivos	25
4. Materiales y métodos	26
4.1. Purificación de las δ -endotoxina Cry1Ab	26
4.2. Obtención de mutantes de lisina de la toxina Cry1Ab	26
4.3. Marcaje fluorescente	29
4.4. Obtención del jugo gástrico, purificación de vesículas de la microvellosidad apical (VMVA) y preparación de vesículas pequeñas unilamelares (vpu)	29
4.5. Secuencia de los extremos N-terminales	30
4.6. Cromatografía de exclusión molecular y de intercambio iónico	31
4.7. Ensayos de unión y de inserción	31
4.8. Mediciones de fluorescencia	32
4.9. Bioensayos	33
5. Resultados	35
5.1. Estudios fluorescentes de la toxina Cry1Ab	35
5.1.1. Análisis de la estructura de la toxina Cry1Ab por su fluorescencia intrínseca	35
5.1.2. Inserción de la toxina Cry1Ab en membranas modelo	40
5.1.3. Uso de sondas fluorescentes extrínsecas para el estudio de la estructura de la toxina Cry1Ab	42
5.1.4. La agregación de la toxina Cry1Ab impide su marcaje fluorescente con FITC	43
5.1.5. Marcaje de las mutantes de lisina	46
5.1.6. Interacción de la toxina Cry1Ab con vesículas de la microvellosidad apical (VMVA) de <i>Manduca sexta</i>	49
5.2. Procesamiento <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de la toxina Cry1Ab: Activación y degradación	53
5.2.1. Digestión de la protoxina Cry1Ab <i>in vitro</i> con jugo gástrico y tripsina	53
5.2.2. Digestión de Cry1Ab <i>in vivo</i>	54
5.2.3. Asociación de las proteínas de 30 kDa obtenidas por procesamiento intramolecular	54
5.2.4. Estudios funcionales de la toxina Cry1Ab	58
5.2.5. Las VMVA tienen proteasas asociadas que activan correctamente a la protoxina Cry1Ab	65
5.2.6. La protoxina desnaturalizada no regresa a su estructura nativa	65

6.	Discusión	72
6.1.	Análisis fluorescente de la toxina CryIAb	72
6.2.	La inserción de las toxinas Cry en membranas	74
6.3.	Procesamiento de la toxina CryIAb	75
6.4.	Comentario final	81
7.	Conclusiones y perspectivas	83
8.	Referencias	86
9.	Anexo: Artículo original	93

Miranda R., Zamudio F. And Bravo A. (2001) Processing of CryIAb δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut protease: Role in protoxina activation and toxin inactivation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. En prensa.

Índice de figuras

1.	Arbol filogenético de las toxinas Cry	12
2.	Análisis de genes <i>cry</i>	13
3.	Mecanismo de acción de las toxinas Cry	15
4.	Estructura primaria de las toxinas Cry	18
5.	Estructura de las toxinas Cry	19
6.	Modelos de inserción de las toxinas Cry en la membrana plasmática	21
7.	Preparación de la toxina Cry1Ab	27
8.	Ensayos de permeabilidad de K ⁺	34
9.	Fluorescencia intrínseca de Cry1Ab	36
10.	Apagamiento de la fluorescencia intrínseca de Cry1Ab	38
11.	Exposición de los triptofanos de Cry1Ab al solvente	39
12.	Interacción de la toxina Cry1Ab con membranas sintéticas	41
13.	Marcaje de la toxina Cry1Ab con FITC	44
14.	Actividad insecticida de las mutantes de lisina	45
15.	Estequiometría de marcaje de las mutantes de lisina con FITC	47
16.	Interacción de la toxina Cry1Ab con VMVA	50
17.	Interacción de la toxina Cry1Ab con VMVA	52
18.	Procesamiento <i>in vitro</i> de la protoxina Cry1Ab	55
19.	Procesamiento <i>in vivo</i> de Cry1Ab	57
20.	Transferencia tipo western de los perfiles de elusión de la protoxina Cry1Ab digerida con jugo gástrico de <i>M. sexta</i>	59
21.	Unión de los fragmentos de digestión de Cry1Ab con jugo gástrico de <i>Manduca sexta</i> en vesículas de la microvellosidad apical de <i>M. sexta</i>	60
22.	Permeabilidad a K ⁺ a través de VMVA de <i>M. sexta</i> inducida por Cry1Ab	62
23.	Activación de la protoxina Cry1Ab con VMVA	66
24.	Las VMVA inhiben la degradación de la toxina y protoxina	67
25.	La región tóxica está protegida del solvente por la protoxina	68
26.	La protoxina desnaturalizada no regresa a su estructura nativa	71

Indice de tablas

1.	Oligonucleótidos mutagénicos	28
2.	Toxicidad de la toxina CryIAb marcada con FITC	48
3.	Secuencia N-terminal de los productos de digestión <i>in vitro</i>	56
4.	Permeabilidad a K ⁺ a través de VMVA de <i>M. sexta</i> inducida por la toxina CryIAb	63
5.	Toxicidad de las proteínas CryIAb contra <i>M. sexta</i>	64
6.	Toxicidad de la toxina CryIAb nativa y desnaturalizada-renaturalizada contra larvas de <i>M. sexta</i>	70
7.	Cortes proteolíticos intramoleculares reportados para las toxinas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i>	76

Abreviaturas

APN	Aminopeptidasa N
BCIP	Sal disódica de fosfato de bromocloroindoilo
BSA	Seroalbúmina bovina
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
C	Colesterol
CL ₅₀	Concentración de toxina que mata al 50% de las larvas.
Dis-C ₃ -(5)	3,3'-dipropiltiodicarbocianina
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
EGTA	Acido etilenglicol-bis(b-aminoetil eter) N,N,N',N'-tetracético
FA	Fosfatasa alcalina
FC	Fosfatidilcolina
FITC	Fluoresceína isotiocianato
HEPES	Acido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2- etanosulfónico]
ICP	Proteínas cristalinas insecticidas
K _{sv}	Constante de apagamiento bimolecular de Stern-Volmer
MeGluCl	Cloruro de metilglucamina
NBT	Nitro azul de tetrazolium
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PVDF	Difloruro de polivinilideno
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
VMVA	Vesículas de la microvellosidad apical
VPU	Vesículas pequeñas unilamelares

1. RESUMEN

La manera en que las toxinas Cry se insertan en la membrana apical del intestino medio de insectos susceptibles, es un t3pico que actualmente est3a siendo estudiado por varios grupos de investigaci3n. La toxina debe sufrir cambios estructurales para pasar de un ambiente hidrof3lico a otro hidrof3bico. Estos cambios pueden ser debidos a alteraciones conformacionales y/o a alteraciones que impliquen la ruptura de enlaces pept3dicos de la toxina. En este trabajo se analiz3 la estructura de la toxina Cry1Ab mediante herramientas de espectroscop3a de fluorescencia. Se explor3 la posibilidad de insertar la toxina en ves3culas artificiales y preparadas a partir de la microvellosidad apical del insecto susceptible, *Manduca sexta*. Sin embargo, no se encontraron las condiciones experimentales para insertar una cantidad suficiente de toxina para su posterior an3lisis estructural como prote3na de membrana.

La protoxina tiene que ser activada a toxina por las proteasas presentes en el intestino medio, siendo este un paso indispensable para la inserci3n de las toxinas Cry. A pesar de esto, no existe un consenso acerca de la mejor manera de activar las toxinas Cry1A. En el presente trabajo se analiz3 el procesamiento *in vitro* e *in vivo* de la toxina Cry1Ab con las proteasas del jugo g3strico de *Manduca sexta* y *Spodoptera frugiperda* y se compar3 con el obtenido *in vitro* con tripsina. Encontramos que la prote3lisis moderada con el jugo g3strico de *M. sexta*, produjo toxina cinco veces m3s activa en formaci3n de poro que la digerida con tripsina. La digesti3n con tripsina gener3 un fragmento de 62 kDa. En contraste, las proteasas del jugo g3strico producen dos cortes adicionales en el extremo N-terminal, removiendo las h3lices $\alpha 1$ y $\alpha 2a$ para producir una prote3na de 58 kDa. Un corte posterior dentro del dominio II divide a la toxina en dos fragmentos de 30 kDa, los cuales permanecen asociados. En ensayos de formaci3n de poro observamos que la toxina m3s activa fue la que perdi3 la h3lice $\alpha 1$. Por otro lado, la aparici3n de los fragmentos de 30 kDa correlacion3 con una disminuci3n en la formaci3n de poro y en la actividad insecticida. Nuestros resultados sugieren que el corte en el dominio II podr3a estar involucrado en la inactivaci3n de la toxina y que los fragmentos de 30 kDa son intermediarios estables en la ruta de degradaci3n.

Por otro lado, encontramos que las ves3culas de la microvellosidad apical que contienen el receptor, tambi3n contienen proteasas asociadas a la membrana que son capaces de procesar correctamente a la protoxina, capacit3ndola para la inserci3n y formaci3n de poro. De esta manera, finalizamos el trabajo describiendo las mejores condiciones de activaci3n que nos permitir3n realizar, en un futuro, los estudios estructurales sobre los cambios que ocurren al insertarse la toxina en membranas.

1a. SUMMARY

The biochemical events that make possible the insertion of Cry toxins in the midgut brush border membrane of susceptible insects, is currently being studied by several research groups. In order to switch from a hydrophilic to a hydrophobic environment, Cry toxin has to suffer structural changes. These changes might be due to alterations in conformation of some or all of the protein and/or peptide bond cleavages. In this work we analyzed the structure of the Cry1Ab toxin with fluorescent spectroscopy tools. Insertion of the toxin into artificial and *Manduca sexta* brush border membrane vesicles was accessed. However, we did not find the experimental conditions to insert an enough amount of toxin for the following structural analysis as a membrane protein.

Protoxin must be activated to toxin by midgut proteases. Activation is a key step for the final insertion of toxin into membrane. Nevertheless, currently, there is not a consensus about the better way to activate Cry1A protoxins. Here, we analyzed the Cry1Ab *in vitro* and *in vivo* processing with the midgut proteases of *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* as compared with that obtained with trypsin. Moderated proteolysis with midgut juice of *M. sexta* did produce a five-fold more active toxin than trypsin, as determined in pore formation assays. Trypsin generated a 62 kDa fragment. In contrast, midgut proteases produced two additional nicks at the N-terminal end removing helices $\alpha 1$ and $\alpha 2a$ to produce a 58 kDa protein. A further cleavage within domain II splits the toxin into two fragments of 30 kDa that remain each other associated. In pore formation assays the most active toxin was that that has loosen the $\alpha 1$ helix. In contrast, the appearance of the 30 kDa fragments correlates with a decrease in pore formation and insecticidal activities. Our results suggest that the cleavage in domain II may be involved in toxin inactivation and that the 30 kDa fragments are stable intermediates in the degradation pathway.

On the other hand, we found that receptor-bearing brush border membrane vesicles also contain membrane-associated proteases, which are able to process the protoxin producing a toxin that inserts into the membrane and form ionic pores. In this way, we describe the best activating conditions that would be relevant for the future studies on the structural changes that the toxin suffer when is in the membrane-inserted state.

2. INTRODUCCION

2.1 Generalidades de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es una bacteria Gram-positiva distribuida en todo el mundo (Martin and Travers, 1989), cuya característica más notable es que durante la fase de esporulación produce inclusiones cristalinas parasporales (Fig. 3a, Whiteley and Schnepf, 1986). Se ha estimado que más del 30% de la proteína celular está contenida en estas inclusiones (Dean, 1984), las cuales están compuestas por proteínas con actividad insecticida que han sido denominadas proteínas insecticidas cristalinas (ICP's, por sus siglas en Inglés) ó δ -endotoxinas. Existen dos superfamilias de δ -endotoxinas, a saber, las proteínas Cry y las proteínas Cyt (Knowles, 1994). Las proteínas Cry son especie específicas y se han utilizado desde la década de los sesenta como bioinsecticidas comerciales contra larvas de insectos que afectan la agricultura y áreas forestales, así como para el control de insectos vectores de patógenos para el ser humano (Guillet *et al.*, 1990; Feitelson *et al.*, 1992; Evans, 1997; Das and Amalraj, 1997).

Powell (1993) estimó que el 2% del mercado mundial de pesticidas es satisfecho con biopesticidas. Dentro de ese mercado *Bt* dominaba el 95% de las ventas (Feitelson *et al.*, 1992). Varios han sido los factores que han hecho posible su éxito en la agricultura. El más importante de ellos es el estrecho rango de huésped y su inocuidad para mamíferos, otros vertebrados, plantas e inclusive otros insectos benéficos (Dean, 1984; Whiteley and Schnepf, 1986). Sólo existe un ejemplo de generación de resistencia a *Bt* en campo (Tabashnik *et al.*, 1990). Esto se debe a que los tiempos de permanencia de las proteínas Cry en el ambiente son muy cortos (Lüthy, 1986; Aronson *et al.*, 1986; Pusztai *et al.*, 1991; Sanchis *et al.*, 1999), por lo que la presión de selección es muy baja. En este sentido, *Bt* ha sido utilizado como una alternativa “verde” para el manejo de plagas agrícolas. Paradójicamente, las ventajas que *Bt* ofrece, también se convierten en importantes desventajas para su uso comercial (Knowles, 1994). El estrecho rango de huésped hace que no se cuente con toxinas para cada plaga que afecta la actividad humana. El reducido tiempo de permanencia en el ambiente hace necesario un profundo conocimiento de la biología y comportamiento de la plaga que se quiere controlar ya que una toxina puede ser activa para un estadio larvario, pero disminuir o incluso no ser tóxica para los siguientes

(Ali *et al.*, 1996; Rausell *et al.*, 2000). Por lo tanto, los tiempos y formas de aplicación deben ser cuidadosamente seleccionados. Por último, existe el riesgo del desarrollo de resistencias por el incremento en el uso de *Bt*, como aspersiones de cristales y sobre todo en plantas transgénicas que expresen constitutivamente una o varias toxinas Cry (Estruch *et al.*, 1997). Esto podría sustituir gradualmente las poblaciones sensibles por otras resistentes (Frutos *et al.*, 1999), con lo cual no sólo se vería reducida la efectividad del bioinsecticida, sino que se reduciría la variabilidad genética de las poblaciones de insectos. En este sentido, una parte de la investigación se ha dirigido a:

- 1) La búsqueda de cepas con nuevas especificidades o incluso con actividades redundantes (Lüthy, 1986; Bravo *et al.*, 1998), éstas últimas para aumentar el arsenal disponible de toxinas para evitar o en su caso manejar las resistencias;
- 2) El estudio del mecanismo de acción de las toxinas sobre sus insectos blanco (Knowles, 1994);
- 3) El estudio de los mecanismos de resistencia (Tabashnik *et al.*, 1990; Van Rie *et al.*, 1990; Oppert *et al.*, 1997; Pietrantonio and Gill, 1996);
- 4) El diseño de estrategias racionales para la aplicación de las biotecnologías desarrolladas a partir de *Bt* (McGaughey and Whalton, 1992; Gould *et al.*, 1997; Sanchis *et al.*, 1999; Tabashnik *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2001);
- 5) El impacto ecológico por el uso de estas tecnologías (Sanchis *et al.*, 1999; Schuler *et al.*, 1999; Hilbeck *et al.*, 1999; Hail, 2000; Agrawal, 2000); entre otros.

A medida que se ha avanzado en el conocimiento de la biología de *Bt*, se ha descubierto que algunas cepas también producen otras proteínas tóxicas. Tal es el caso de las δ -endotoxinas Cyt que en *Bt* var. *israelensis* forman parte de las inclusiones cristalinas y que son hemolíticas *in vitro* (Thomas and Ellar, 1983); de las proteínas insecticidas de la fase vegetativa (VIP, por sus siglas en Inglés) que son secretadas al ambiente (Estruch *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1997) y aunque a la fecha se sabe poco sobre sus efectos en otros organismos, estas proteínas podrían resultar en una nueva alternativa para el control de algunos insectos (Estruch *et al.*, 1996); de las enterotoxinas (Siegel, 2001) y las α - y β -exotoxinas (Dulmage, 1978; Vanková, 1978) que por ser tóxicas a mamíferos representan uno de los mayores problemas para el uso comercial de algunas cepas de *Bt*.

Dado que el interés de este trabajo está centrado en las toxinas Cry, en lo subsiguiente nos referiremos casi exclusivamente a ellas.

2.2 Clasificación de las toxinas Cry

A partir de que se clonó y secuenció el primer gen de una δ -endotoxina (Schnepf and Whiteley, 1981) se han clonado y caracterizado muchos otros genes *cry*. El crecimiento de la base de datos ha sido constante y continúa en ascenso. Por este motivo, los programas de búsqueda de nuevos genes *cry* siguen siendo extensivos (Bravo *et al.*, 1998; Iriarte *et al.*, 1998; Kim, 2000). Hasta el 8 de febrero de 2001 han sido registrados 185 genes.

El anterior sistema de clasificación ponderaba el espectro de actividad de las δ -endotoxinas y su homología a nivel de secuencia de aminoácidos, deducida a partir de las secuencias de sus genes respectivos (Höfte and Whiteley, 1989). En esta clasificación, las toxinas Cry se sistematizaron en cuatro grupos: CryI, con actividad contra lepidópteros, CryII con actividad dual contra lepidópteros y dípteros, CryIII con actividad contra coleópteros y finalmente CryIV contra dípteros. Sin embargo, en este esquema aparecieron inconsistencias debido a los intentos de acomodar toxinas altamente homólogas con otras previamente conocidas pero con espectros insecticidas distintos (Crickmore *et al.*, 1998).

La clasificación vigente de las toxinas Cry (Crickmore *et al.*, 1998) se basa únicamente en la organización de las secuencias deducidas de aminoácidos en un árbol filogenético (Fig. 1). La nomenclatura es jerárquica y se definieron cuatro categorías de acuerdo al porcentaje de identidad entre las secuencias. En este sistema se conservó el mnemónico Cry y en la primera categoría se cambiaron los números romanos por arábigos, los cuales permiten diferenciar toxinas con menos del 45% de identidad. Proteínas con la misma categoría primaria frecuentemente afectan el mismo orden de insectos. Existen excepciones, las toxinas Cry1B y Cry11, que a diferencia del resto de las toxinas Cry1, tienen actividades duales contra coleópteros o dípteros, respectivamente (Bradley *et al.*, 1995; Kim, 2000). La segunda categoría se denota con una letra mayúscula que distingue entre secuencias que tienen entre 45 y 78% de identidad. La tercera categoría es designada con una letra minúscula y las toxinas que comparten esta categoría muestran entre 78 y 95% de los residuos idénticos. Las toxinas que difieren en la segunda y tercera categoría podrían tener potencias alteradas y/o distintos blancos dentro de un mismo orden.

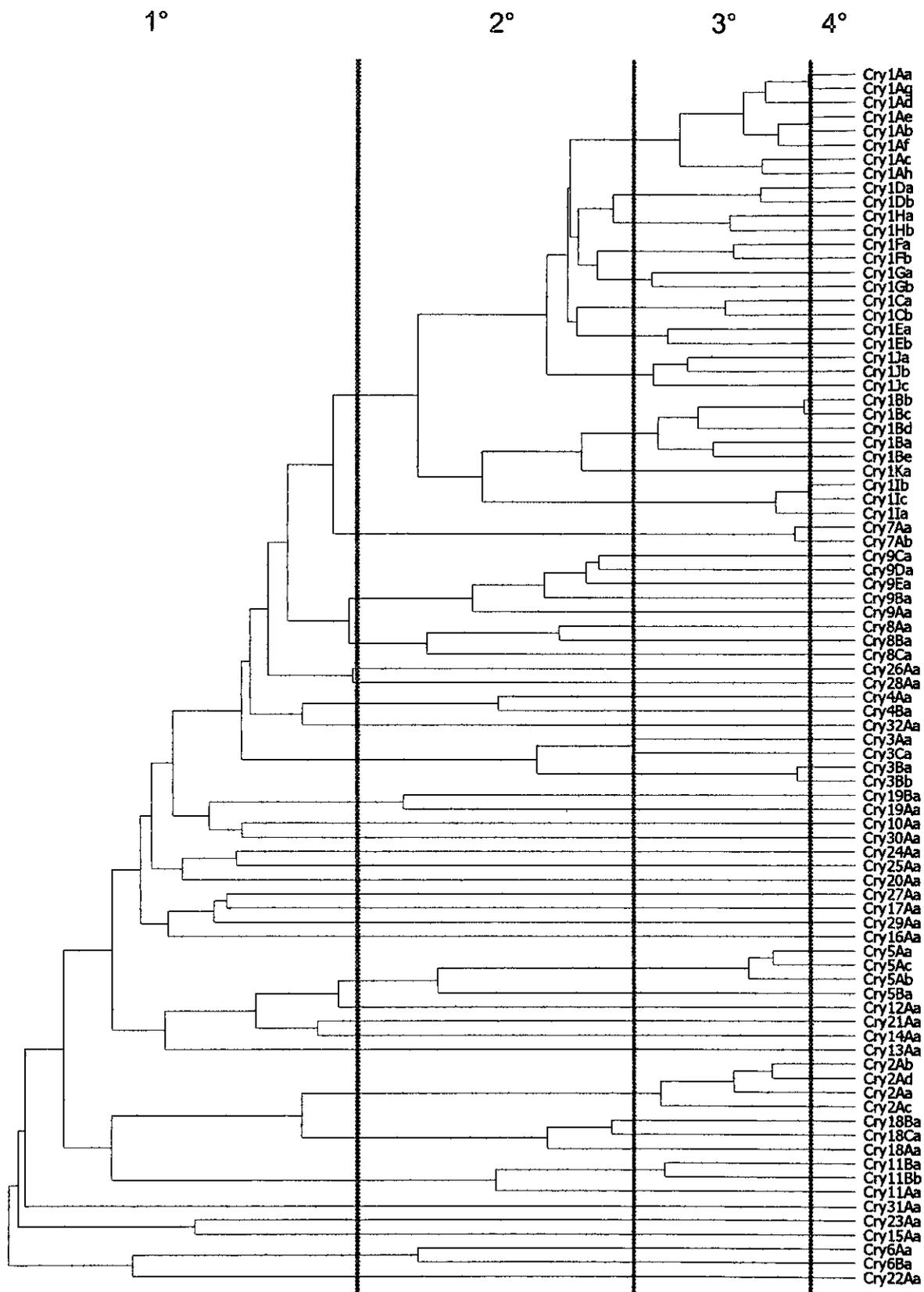


Figura 1. Arbol filogenético de las toxinas Cry. Las líneas verticales demarcan las cuatro categorías utilizadas para la nueva clasificación de las proteínas Cry. Tomado de Crickmore *et al.*, 2000.

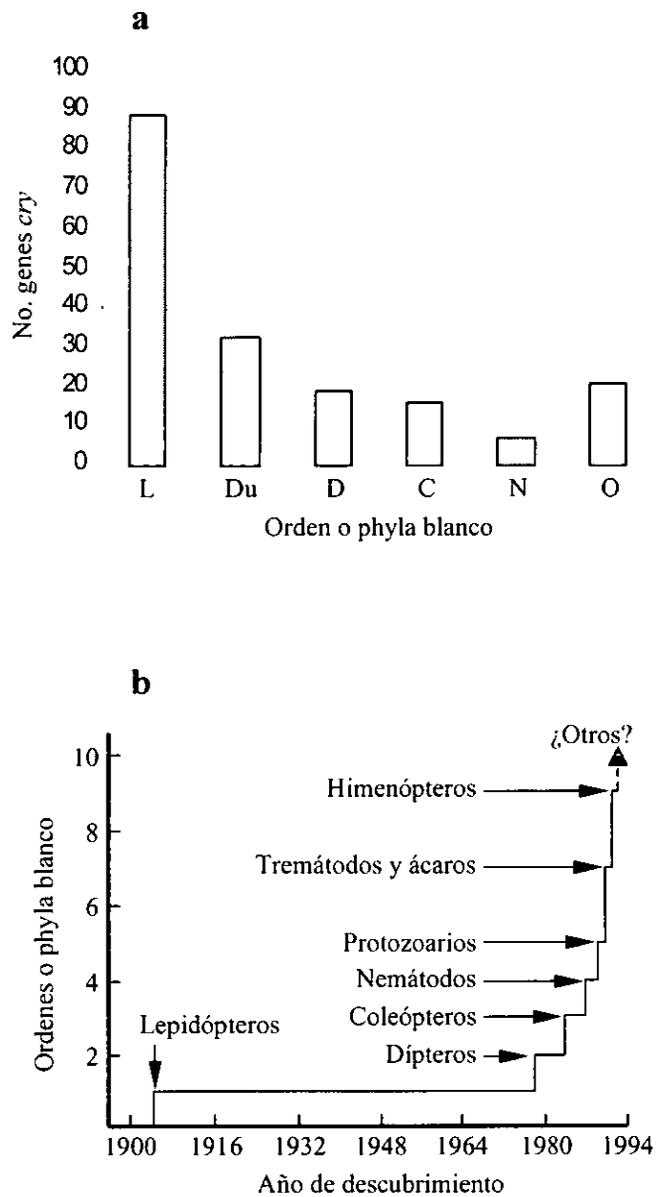


Figura 2. Análisis de genes *cry*. a) Número de genes que codifican para toxinas con actividad insecticida contra: L, lepidópteros; Du, actividad dual contra lepidópteros y dípteros o lepidópteros y coleópteros; D, dípteros; N, nemátodos; O, Otros. b) Año de descubrimiento de actividad contra los diferentes ordenes o phyla (modificado de Feitelson, 1993).

Finalmente, con el objeto de diferenciar aquellas toxinas que tienen identidades de entre 95 y 100%, se asignó una última categoría que implica unas cuantas mutaciones puntuales dentro de un mismo gen o inclusive toxinas idénticas que presentan diferencias en la secuencia nucleotídica. La base de datos de *Bt* puede ser consultada libremente en la siguiente dirección de internet: http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/.

El comité de nomenclatura de las δ -endotoxinas de *Bt* (Crickmore *et al.*, 2001) actualiza constantemente esta base de datos y los 185 genes reportados se agrupan en 88 holotipos y 32 categorías primarias. Más del 50% de los genes *cry* reportados codifican para toxinas activas contra lepidópteros (Fig. 2a). Sin embargo, se han aislado genes *cry* que codifican para δ -endotoxinas activas contra insectos de los ordenes Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Himenoptera, Homoptera, y Mallophaga, así como para otros organismos no insectos tales como ácaros, nemátodos y platihelminthos (Edwards *et al.*, 1988; Beegle and Yamamoto, 1992; Payne *et al.*, 1993; Feitelson, 1993). La Figura 2b muestra gráficamente un análisis histórico del descubrimiento de toxinas de *Bt* con especificidad para diferentes organismos blanco.

2.3 Mecanismo de acción

Las proteínas Cry son sintetizadas, durante la esporulación, como protoxinas que cristalizan formando inclusiones de hasta 1 μm de longitud (Fig. 3a, Bechtel and Bulla, 1976; Grochulski *et al.*, 1995). Cuando un organismo susceptible ingiere los cristales, éstos son solubilizados (Fig. 3b) en el ambiente del intestino medio que en el caso de lepidópteros y dípteros es alcalino y reductor (Dow, 1992). La protoxina soluble es activada mediante digestión proteolítica (Fig. 3c). Se presume que las proteasas digestivas que se encuentran en el jugo gástrico del intestino medio son las responsables del procesamiento que remueve una pequeña región en el extremo N-terminal (29-58 residuos), así como la mitad de la proteína desde el extremo C-terminal. La toxina activa se une tanto a la membrana peritrófica como a receptores encontrados en las microvellosidades de las células del epitelio intestinal (Fig. 3d, Bravo *et al.*, 1992). Esta última interacción es muy específica, las constantes de afinidad de diferentes toxinas por proteínas presentes en membranas del intestino medio de diferentes insectos es del orden nanomolar. Este dato se ve reflejado en que para observar un aumento en la permeabilidad de membranas que

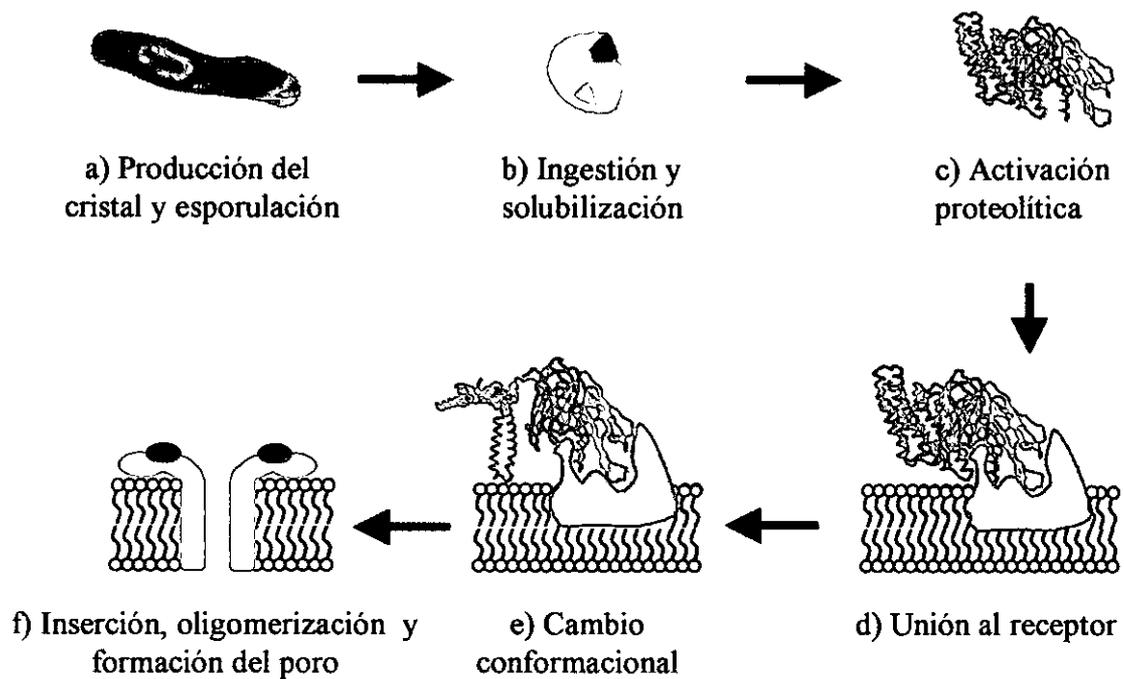


Figura 3. Mecanismo de acción de las toxinas Cry. a) *Bacillus thuringiensis* produce las inclusiones cristalinas durante la fase de esporulación. b) Una vez ingeridos por un insecto susceptible, los cristales son solubilizados en el ambiente alcalino y reductor del intestino medio, c) la protoxina es activada mediante digestión por las proteasas del insecto, d) la toxina se une a los receptores localizados en la microvellosidad apical del intestino medio, e) esto podría inducir cambios conformacionales que llevan a la toxina hasta un estado competente para la inserción y f) una vez insertada, la toxina genera poros iónicos que permiten el paso de iones y agua hacia el interior de la célula, lo que eventualmente termina en lisis y muerte del insecto (modificado de De Maagd *et al.*, 2001).

contienen receptor, se requieren concentraciones nanomolares de toxina (Lorence *et al.*, 1995).

Las proteínas que se han propuesto como posibles receptores de una o más de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1C son la aminopeptidasa N (APN) y una proteína de la familia de las cadherinas (cadherina E). Las APN de *M. sexta* (Sangadala *et al.*, 1994; Knight *et al.*, 1994; Denolf *et al.*, 1997), *Heliothis viresces* (Gill *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1997a), *Lymantria dispar* (Valaitis *et al.*, 1995), *Plutella xylostella* (Denolf *et al.*, 1997) y *Bombyx mori* (Yaio *et al.*, 1997) y las cadherinas E de *M. sexta* (Vadlamudi *et al.*, 1995), y de *B. mori* (Nagamatsu *et al.*, 1998) han sido purificadas y caracterizadas. Se desconoce cuál es el papel del receptor en la actividad insecticida de las toxinas Cry. Se ha sugerido que podría participar aumentando la concentración local de toxina en la vecindad de la membrana, facilitando la inserción (Pietrantonio and Gill, 1996). En el caso de las proteínas parecidas a la cadherina E se propuso que la toxicidad podría estar mediada por un evento de señalización que termina en la muerte apoptótica de las células del epitelio intestinal (Keeton and Bulla, 1997). Para determinar el papel del receptor en la intoxicación por proteínas Cry, se han realizado experimentos de expresión tanto de la aminopeptidasa N como la cadherina E en sistemas heterólogos. Las APN de *M. sexta* y *Epiphyas postvittana* se expresaron en la línea celular Sf9 de *S. frugiperda* (Denolf *et al.*, 1997; Simpson and Newcomb, 2000). Por otra parte, la cadherina E de *M. sexta* se expresó en las líneas de humano COS-7 y HEK-293 (Vadlamudi *et al.* 1995) y en las líneas de insecto Sf21 (Keeton and Bulla, 1997). Aun cuando las células expresaron estas proteínas en su superficie, en todos estos experimentos, ni la APN ni la cadherina E fueron capaces de volver sensibles a las líneas celulares al efecto de la toxina. La cadherina E de *B. mori* es el único receptor que, expresado en células Sf9, resultó en una mayor sensibilidad de estas células a la toxina Cry1Aa (Nagamatsu *et al.*, 1999).

No se sabe cuál es el papel del receptor en la inserción de la toxina a la membrana. Se piensa que ésta debe sufrir grandes cambios conformacionales antes de que pase de un ambiente hidrofílico a un ambiente hidrofóbico (Fig. 3e). Es posible que la interacción toxina-receptor dispare este cambio conformacional en la toxina, llevándola a un estado competente para la inserción (Pietrantonio and Gill, 1996), aun cuando también se ha postulado que el ambiente alcalino y/o la activación proteolítica podrían estar involucrados

en este fenómeno. Sea cual fuere la participación del receptor, se cree que *in vivo* juega un papel estrictamente necesario para la subsiguiente penetración en la membrana, debido a que en ausencia de receptor y a concentraciones fisiológicas, las toxinas Cry no son capaces de insertarse espontáneamente en membranas naturales (Knowles, 1994).

La inserción es irreversible y aun cuando no se conoce la forma en que ocurre, se han postulado dos modelos que han centrado su atención en la estructura del dominio formador del poro (véase la sección 2.4). Lo que resulta incuestionable en el modo de acción de las toxinas Cry, es que generan poros iónicos (Fig. 3f) muy grandes con diámetro interior de 6-10 Å (Knowles and Ellar, 1987) y conductancias de 40-800 pS (von Tersch *et al.*, 1994). Son poros poco selectivos que provocan la entrada, principalmente de K⁺, con la consiguiente despolarización de la membrana. Además, como consecuencia de la entrada osmótica de agua, la célula se hincha y eventualmente muere por lisis (Knowles and Ellar, 1987). Los primeros síntomas de la intoxicación son la casi inmediata parálisis de la motilidad intestinal y la detención de ingesta. Después de uno o dos días, una vez que la barrera impuesta por el intestino ha sido superada, las esporas germinan en el ambiente altamente nutritivo del hemocele y el insecto muere por inanición y septicemia.

2.4 Estructura de las toxinas Cry

La mayoría de las toxinas Cry tienen 5 bloques altamente conservados (Fig. 4). Basándose en esto, Höfte and Whiteley (1989) propusieron que la estructura tridimensional de las proteínas Cry debería de ser conservada y que las toxinas Cry tienen mecanismos de acción semejantes. Esto fue corroborado con la solución de las estructuras de las toxinas Cry3Aa (Fig. 5a, Li *et al.*, 1991) y Cry1Aa (Fig. 5b, Grochulski *et al.*, 1995). La obtención de estas estructuras ha representado uno de los avances más significativos en el entendimiento del mecanismo de acción de las δ -endotoxinas de *Bt*. Las estructuras primarias de las toxinas Cry3Aa y Cry1Aa son 36% idénticas, sin embargo, a nivel de estructura terciaria se encontró un sorprendente parecido entre ellas (Grochulski *et al.*, 1995). Ambas son proteínas globulares conformadas por tres dominios y los dominios correspondientes muestran el mismo plegamiento topológico. La similitud estructural no se encuentra distribuida uniformemente a lo largo de la proteína, sino que varía entre dominios. Mediante la comparación filogenética se ha sugerido que los dominios I y II

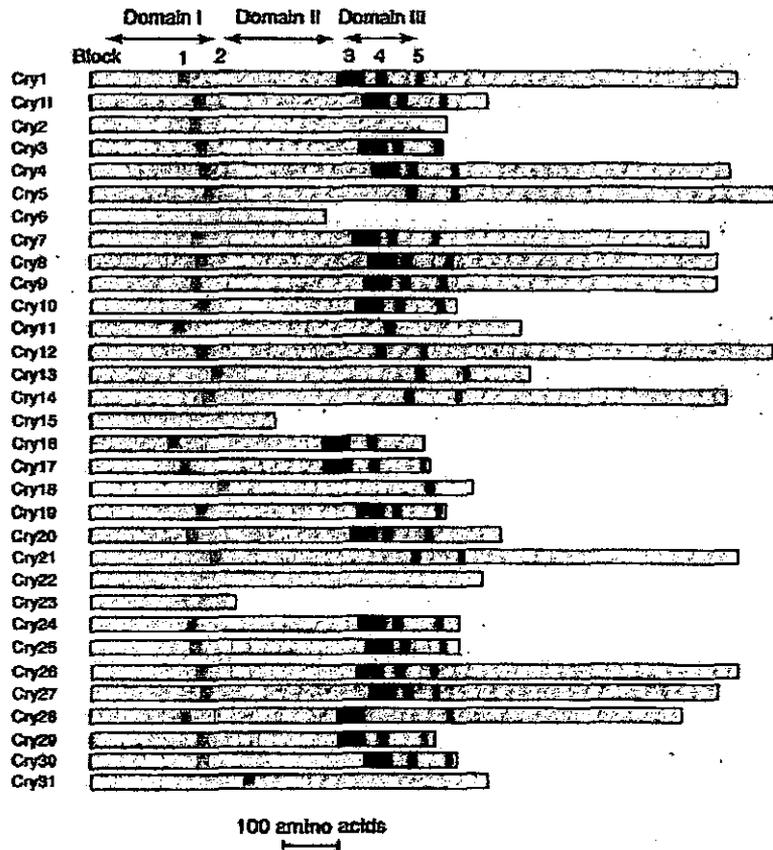


Figura 4. Estructura primaria de las toxinas Cry. Longitudes relativas de las protoxinas Cry y posición de los cinco bloques conservados. Las posiciones de los tres dominios de las toxinas Cry1A activadas son señaladas. La región C-terminal y un pequeño fragmento de la N-terminal son digeridos por las proteasas del jugo gástrico durante el proceso de activación (Tomado de De Maagd *et al.*, 2001).

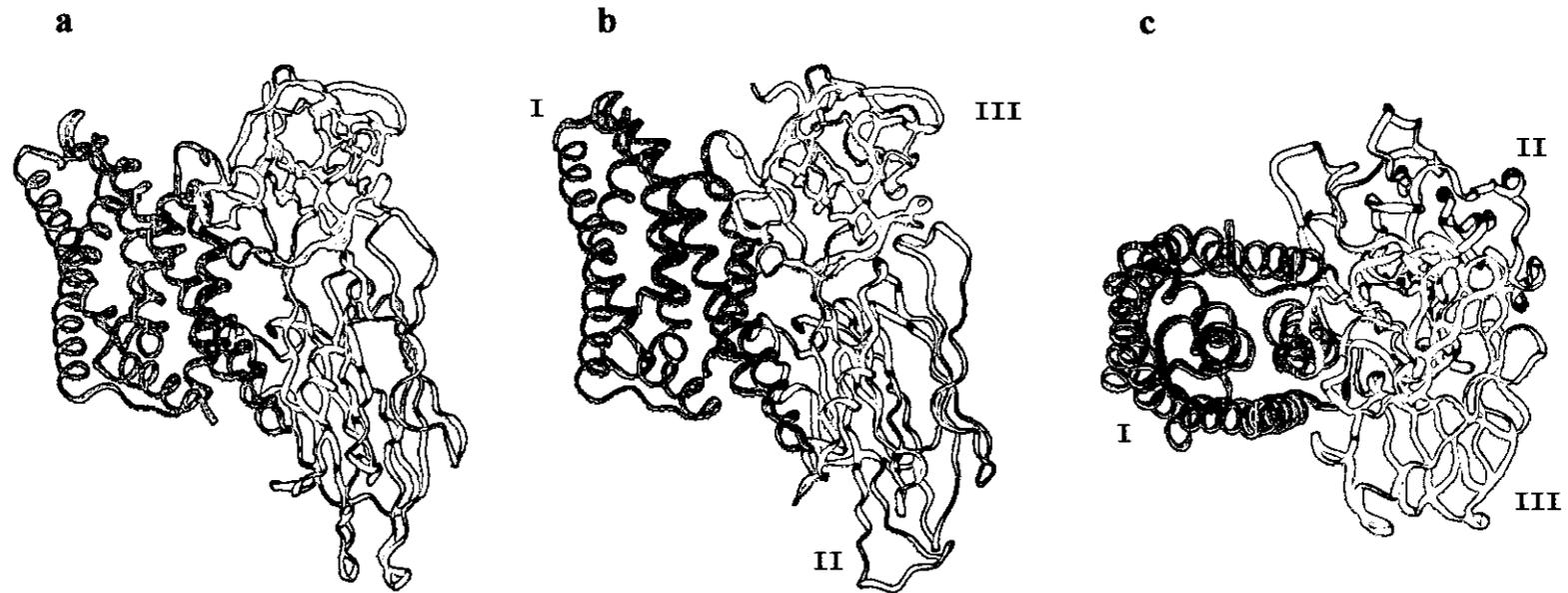


Figura 5. Estructura de las toxinas Cry. a) Cry3A, b) Cry1Aa, c) Cry1Aa, vista desde arriba. Imágenes generadas en InsightII a partir de los archivos PDB correspondientes. El dominio I se dibuja en azul, dominio II en rojo y dominio III en verde. El dominio I está formado por 7 hélices α en un ramillete en el que la hélice $\alpha 5$ se encuentra en el centro (c). Este dominio está involucrado en la inserción y formación del poro. Los dominios II y III están formados por hojas plegadas β y están implicados en la especificidad de las toxinas Cry. Las asas en la parte inferior del dominio II reconocen al receptor. El intercambio del dominio III entre toxinas Cry con diferentes especificidades, provoca intercambios de especificidad.

coevolucionaron, mientras que el dominio III evolucionó independientemente (Bravo, 1997).

El dominio I está constituido por siete hélices α antiparalelas y anfipáticas. Seis de estas hélices forman un ramillete que rodea a la hélice $\alpha 5$ (Fig. 5c), la cual corresponde a la primera de las 5 regiones conservadas. Exceptuando las hélices $\alpha 1$, $\alpha 2a$ y $\alpha 2b$, las restantes hélices α tienen una longitud de más de 30Å, por lo cual son de tamaño suficiente para atravesar la membrana. Este mismo patrón se encuentra, con sus respectivas particularidades, en los dominios formadores de poro de la Colicina A y de la toxina diftérica (Parker and Pattus, 1993; Choe *et al.*, 1992; Grochulski *et al.*, 1995). Estos datos estructurales sugieren que el dominio I es el responsable de la formación del poro. En apoyo a esto, se reportó que a altas concentraciones, las toxinas Cry (Walters *et al.*, 1993; von Tersch *et al.*, 1994), el dominio I (Grochulski *et al.*, 1995) e inclusive péptidos de la hélice $\alpha 5$ (Cummings *et al.*, 1994; Gazit *et al.*, 1994) generan poros en ausencia de receptor, cuando se prueban con bicapas lipídicas artificiales. Sin embargo, estos poros son diferentes en tamaño y cinética a los formados con membranas que contienen el receptor (Knowles *et al.*, 1994). Recientemente, se mostró que la sustitución de ocho residuos de la hélice $\alpha 7$ por los residuos 311-319 del fragmento B de la toxina diftérica, aumenta la toxicidad de CryIAc contra *Helicoverpa armigera* y produce canales de mayor conductancia que la toxina silvestre en bicapas artificiales (Chandra *et al.*, 1999), por lo que se propone que esta hélice α está directamente involucrada en la formación del poro.

Se han propuesto modelos de inserción de las toxinas Cry en las membranas. El modelo de sombrilla (Fig. 6a) propone que las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ penetran la bicapa, mientras que las demás se mantienen paralelas a la superficie de la membrana (Li *et al.*, 1991). El modelo de abrecartas (Fig. 6b), implica la inserción de las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ a la membrana, sin ningún reordenamiento estructural de las demás hélices (Hodgman and Ellar, 1990). Recientemente se ha propuesto un tercer modelo que implica la inserción de toda la toxina a la membrana, exceptuando la hélice $\alpha 1$ (Aronson and Shai, 2001). Actualmente, el modelo de sombrilla es el que tiene más soporte experimental. Se ha observado que las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ no soportan cambios fácilmente, debido a que la toxina pierde su actividad (Wu and Aronson, 1992). El análisis de la estructura cristalográfica ha demostrado que $\alpha 4$ segrega los residuos

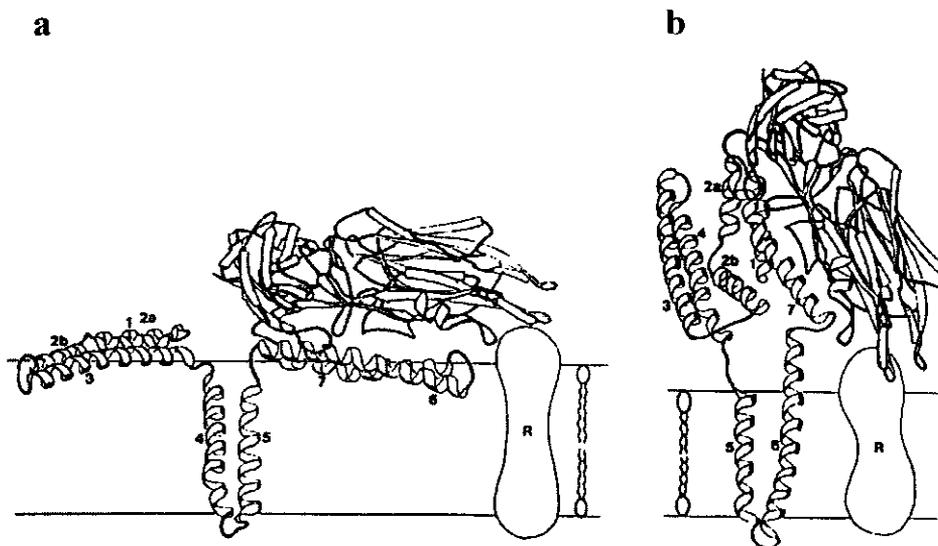


Figura 6. Modelos de inserción de las toxinas Cry en la microvellosidad apical del intestino medio. Las hélices α están numeradas a partir del N-terminal. El receptor se indica como R. a) Modelo de sombrilla (Li *et al.*, 1991). Las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ se insertan mientras que las hélices restantes se mantienen sobre la superficie de la membrana. b) Modelo de abrecartas (Hodgman and Ellar, 1990). Las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ se insertan a la membrana sin mayor reordenamiento estructural de las demás hélices. (Modificado de Knowles, 1994).

con carga en una cara de la hélice. Se ha sugerido que la cara con residuos cargados de $\alpha 4$ se orienta hacia el lumen del poro, mientras que la hélice $\alpha 5$ podría estar en contacto con la membrana (Aronson *et al.*, 1999; Masson *et al.*, 1999). También se ha propuesto que la hélice $\alpha 5$ podría participar en la oligomerización. Sin embargo, esto último es controversial debido a que la mutante H168R, siendo tres veces más tóxica que la silvestre, no forma oligómeros cuando es incubada con VMVA (Aronson *et al.*, 1999). Mediante una estrategia de complementación de función entre dos mutantes de Cry1Ab, afectadas en diferentes pasos en el mecanismo de acción (una afectada en formación de poro y la otra en unión al receptor), quedó bien establecido que los monómeros de Cry1Ab son capaces de interactuar unos con otros para formar poros funcionales y recuperar la toxicidad (Soberón *et al.*, 2000). Sería interesante determinar el mecanismo de oligomerización, las regiones implicadas, así como el número de moléculas de toxina por poro. Se tiene evidencia de que la formación del poro requiere el desdoblamiento de la interfase entre los dominios I y II, en la que se encuentran 4 de los 16 puentes salinos existentes en la toxina, como fue observado mediante experimentos de restricción del movimiento, a través de formación de puentes disulfuro por ingeniería genética, que impide la separación de la hélice $\alpha 7$ del dominio I y la hoja $\beta 1b$ del dominio II (Schwartz *et al.*, 1997a).

El dominio menos conservado en secuencia y estructura terciaria entre las dos toxinas cristalizadas es el dominio II. Este dominio está formado por tres láminas plegadas β y por tres asas. Las dos primeras láminas plegadas β están formadas por cuatro hojas β antiparalelas, mientras que la última sólo tiene 3 hojas β y dos pequeñas hélices α (Grochulski *et al.*, 1995). En las asas de estas láminas β se observa la mayor diferencia estructural. En base a estudios de mutagénesis dirigida (Lu *et al.*, 1994; Smith and Ellar, 1994), se ha propuesto que el dominio II juega un papel fundamental en la especificidad de la toxina, donde las asas interaccionan con el receptor localizado en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio (Grochulski *et al.*, 1995; Rajamohan *et al.*, 1996; Jurat-Fuentes and Adang, 2001). La interfase entre los dominios I y II está formada por contacto entre la parte N-terminal de la hélice $\alpha 7$ (segunda región conservada) y el asa formada entre $\alpha 6$ - $\alpha 7$ (dominio I) con $\beta 1b$ -asa- $\alpha 8$ (dominio II). En contraste, las caras externas de las láminas $\beta 1a$ y $\beta 2$ están expuestas al solvente. Como se mencionó, en esta

interfase se encuentran 4 de los 16 puentes salinos existentes en la proteína. Esta interacción podría jugar un papel en la estabilización de la estructura de la toxina activa (Grochulski *et al.*, 1995). Además, si estas interacciones resultaran debilitadas por la unión de la toxina con el receptor o por la presencia de la membrana plasmática, los dos dominios podrían alejarse uno de otro y esta separación podría ser importante al comienzo del proceso de inserción (Grochulski *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1997a).

El dominio III se forma por dos láminas plegadas β antiparalelas formando un sándwich. La lámina exterior es accesible al solvente, mientras que la interior se encuentra de cara a los otros dos dominios. Dos asas que se extienden desde el cuerpo principal del dominio III, forman parte de la interfase en la interacción con las hélices $\alpha 6$ y $\alpha 7$ del dominio I. Se ha propuesto que este dominio protege a la toxina de la acción proteolítica de las enzimas digestivas (Li *et al.*, 1991) y que la interacción entre los dominios I y III es importante para la estabilidad e integridad de la protoxina (Nishimoto *et al.*, 1994). Sin embargo, se han encontrado diversas mutantes en el resto de la proteína que también tienen efecto sobre la estabilidad (Alcantara *et al.*, 2001). Más significativamente, se han encontrado evidencias de que el dominio III está involucrado en la especificidad de la toxina ya que el intercambio del dominio III entre diferentes toxinas provocó un intercambio en su especificidad (Bosch *et al.*, 1994; Masson *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995). Por medio de mutagénesis sitio-dirigida e intercambio de fragmentos por recombinación *in vivo* entre las toxinas CryIE y CryIC, se han encontrado bloques del dominio III, e inclusive residuos sencillos dentro de estos bloques, que son estrictamente necesarios para la toxicidad de CryIC contra *S. exigua* (de Maagd *et al.*, 1999).

La toxina CryIAc es un caso especial dentro de las toxinas Cry. Es la única en que se ha descrito una interacción con el receptor APN en la que participa un componente carbohidrato que contiene residuos de N-acetilglucosamina. El sitio de unión a este azúcar se encuentra en el dominio III y los residuos N506, Q509 y Y513 están implicados en la interacción de la toxina CryIAc con el azúcar (Burton *et al.*, 1999).

Por otra parte, se ha propuesto que una región rica en argininas, dentro de $\beta 17$ que forma parte del cuarto bloque conservado, podría funcionar como sensor de voltaje (Chen *et al.*, 1993). En un reporte posterior se demostró que en bicapas artificiales las conductancias de las mutantes R521 y R527 de CryIAa disminuyeron y que la probabilidad

de apertura de estas mutantes presenta una dependencia de voltaje diferente a la silvestre. (Schwartz *et al.*, 1997b).

A pesar de que se conoce su estructura tridimensional, la forma en que las toxinas Cry se insertan, y su estructura como proteína de membrana, apenas comienza a estudiarse. Los únicos datos publicados sobre este tópico han sido obtenidos mediante 1) el uso de péptidos sintéticos y su interacción con membranas artificiales (Gazit *et al.*, 1998) y 2) mediante la restricción covalente del movimiento de las hélices α del dominio I (Schwartz *et al.*, 1997a). En estos estudios se propone que las hélices α_4 y α_5 penetran la membrana, mientras que las restantes se mantienen perpendiculares a las dos primeras y que la actividad de formación de poro depende de la flexibilidad en el movimiento de las hélices y de la disolución de la interfase entre los dominios I y II (Schwartz *et al.*, 1997a).

En este trabajo nos interesa conocer cuáles son las modificaciones estructurales que sufren las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*, para llegar a ser proteínas integrales de membrana. Estos cambios en estructura pueden ser debidos a alteraciones conformacionales o a alteraciones que impliquen la ruptura de enlaces peptídicos de la toxina, por lo que aquí se plantearon los siguientes objetivos:

3. OBJETIVOS

- I. Analizar los cambios conformacionales de la toxina Cry1Ab insertada en membranas.
- II. Analizar el proceso de activación *in vitro* e *in vivo* por digestión proteolítica de la toxina Cry1Ab.

Para abordar el primer objetivo, nos planteamos comparar la estructura de la toxina Cry1Ab en fase acuosa e insertada en membranas artificiales y naturales, mediante el uso de herramientas de espectroscopía de fluorescencia.

En el segundo objetivo, nos interesó encontrar la mejor condición de activación de la toxina Cry1Ab. Para ello, estudiamos el procesamiento proteolítico de la protoxina con tripsina y con jugo gástrico del intestino medio de larvas de *Manduca sexta* y *Spodoptera frugiperda*, las cuales son susceptibles y tolerantes, respectivamente, a la actividad insecticida de esta proteína.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Purificación de la δ -endotoxina Cry1Ab

Los cristales de Cry1Ab fueron producidos en la cepa acristalífera *Bt407cry* transformada con el plásmido pHT315 (Arantes and Lereclus, 1991) conteniendo el gen *cry1Ab* (pHT315-1Ab). La cepa transformante fue cultivada por 3 días a 29°C en medio de esporulación HCT (Lereclus *et al.*, 1995) conteniendo eritromicina, 10 μ g/ml. Una vez que la esporulación fue completa, los cristales fueron purificados por gradientes de sacarosa (Thomas and Ellar, 1983b). Los cristales fueron solubilizados en Na₂CO₃ 50 mM, pH 10.5, β -mercaptoethanol 0.2% a 37°C por 2 h (Fig. 7).

La protoxina (20 μ g) fue digerida con tripsina (37°C) o con jugo gástrico de *M. sexta* o de *S. frugiperda* (30°C), a diferentes relaciones de proteasa/protoxina por 2 o 13 h. La digestión fue detenida con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM. Las muestras fueron centrifugadas a 16,000 x g por 10 minutos y la toxina, contenida en el sobrenadante, fue cosechada. La concentración de proteína fue determinada con el reactivo de Bio-Rad (Bio-Rad Labs. Hercules, CA), utilizando seroalbúmina de bovino (BSA) como proteína de referencia.

Para el procesamiento *in vivo* de Cry1Ab, las larvas de quinto instar de *M. sexta* fueron forzadas a ingerir 10 μ g de protoxina. A diferentes tiempos post-ingestión, el intestino medio fue disectado y la fracción soluble y el material sólido del bolo alimenticio fueron separados por centrifugación. Las muestras se separaron en un gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE 10%), y la proteína fue transferida a una membrana de nitrocelulosa e inmunodetectada con un anticuerpo policlonal anti-Cry1A (1/10,000) (Bravo *et al.*, 1992).

4.2 Obtención de mutantes de lisina de la toxina Cry1Ab.

La mutagénesis conservativa para remover secuencialmente cada uno de los tres residuos de lisina de Cry1Ab, fue realizada con un método de mutagénesis sitio-dirigida por extensión de fragmentos traslapados, obtenidos por PCR mediante el uso de oligonucleótidos mutagénicos (Tabla 1), como se reportó previamente (Meza *et al.*, 1996). Como templete, se utilizó un fragmento *EcoRV* de 847 pb del gen *cry1Ab* clonado en el

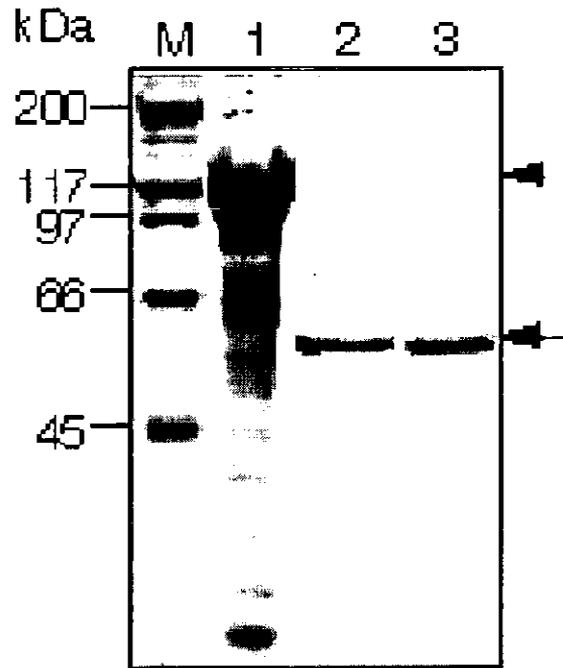


Figura 7. Preparación de la toxina Cry1Ab. Los cristales aislados por gradiente de sacarosa fueron solubilizados en Na_2CO_3 50 mM, pH 10.5, β -mercaptoethanol 0.2% a 37°C por 2 h. El pH del solubilizado fue ajustado a 8.5 con Tris-HCl 1M y se adicionó tripsina 1/50 (w/w). La digestión se realizó a 37°C y después de 2 h, se adicionó PMSF a concentración final de 1 mM. Los productos de digestión fueron purificados por cromatografía de intercambio iónico en una columna HiTrap Q de 1 ml. Cada uno de estos pasos fue monitoreado mediante SDS-PAGE. Carriles: 1) Solubilizado, 2) Procesado con tripsina, 3) Proteína purificada por intercambio iónico, M) Marcadores de peso molecular. La flecha señala la posición de la toxina y la punta de flecha la de la protoxina.

Tabla 1. Oligonucleótidos mutagénicos que se utilizaron para la mutagénesis conservativa para remover los residuos de lisina de la toxina CryIAb.

Nombre	Secuencia ^a
K403R.20	5´ - TATACAGAAGAGCGGAACG
K478R.26	5´ - CCTTTAACAAGATCTACTAATCTTGG
K478R(c).26	5´ - CCAAGATTAGTAGATCTTGTAAAGG
K490R(c).22	5´ - CTGGTCCTCTAACGACAGAAGT
T3.24	5´ - GCGCGAAATTAACCCTCACTAAAG
T7.24	5´ - CGCGCGTAATACGACTCACTATAG

^a Las bases subrayadas muestran el cambio en el codón de lisina por el de arginina.

plásmido pSK. Los productos mutagénicos fueron clonados en los sitios *Bam*HI y *Hind*III de pSK y secuenciados en doble cadena. Los fragmentos mutantes fueron digeridos con *Sfu*I y subclonados en el plásmido pHT315 conteniendo un gen *cry*1Ab, al cual previamente se le removió el fragmento *Sfu*I. El gen así regenerado fue electroporado en la cepa acristalífera *Bt*407 cry^- y seleccionado en placas de LB eritromicina 10 μ g/ml. Las transformantes fueron analizadas por su capacidad para formar cristal. Además se analizó la solubilización, procesamiento con tripsina y actividad de los cristales en bioensayos contra larvas de primer instar de *M. sexta*.

4.3 Marcaje fluorescente

La toxina Cry1Ab y las mutantes de lisina fueron purificadas por cromatografía de intercambio iónico y marcadas con fluoresceína isotiocianato (FITC, Molecular Probes, Eugene, OR) en amortiguador de boratos 50 mM, pH 9, en oscuridad y a temperatura ambiente por 16 h. La FITC no unida fue removida mediante cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-25. La estequiometría del marcaje fue determinada mediante la obtención del espectro de absorción de 250 a 550 nm. Los valores a 280 y 495 nm fueron utilizados para calcular las concentraciones de proteína y de FITC, respectivamente. Para ello, se consideraron los coeficientes de extinción molar del FITC ($76,000 \text{ M}^{-1}$, Molecular Probes, Eugene, OR) y de la toxina ($78,626 \text{ M}^{-1}$), y que la absorción del FITC a 280 nm es el 40% de la absorción a 495 nm (Sepulveda-Becerra *et al.*, 1996). La toxina marcada fue analizada por Western blot con un anticuerpo monoclonal anti-FITC conjugado con fosfatasa alcalina y visualizado con el sustrato cromogénico NBT y BCIP (de Maio, 1994).

4.4 Obtención del jugo gástrico, purificación de vesículas de la microvellosidad apical (VMVA) y preparación de vesículas pequeñas unilamelares (vpu)

Los huevos de *M. sexta* fueron amablemente donados por el Dr. Jorge Ibarra (CINVESTAV-IPN, Mexico). Las larvas de *S. frugiperda* fueron criadas por la Biol. Laura Lina (CEIB-UAEM). Las larvas de *S. frugiperda* y de *M. sexta* fueron alimentadas sobre una dieta artificial como se describió previamente (Bell and Joachim, 1976). Las larvas de *M. sexta* y *S. frugiperda* de quinto instar fueron enfriadas 10 minutos sobre hielo y el intestino medio disectado. El jugo gástrico de ambos insectos fue separado del material

sólido mediante centrifugación y filtrado a través de membranas de 0.22 μm (Millipore Co., Bedford, MA). La proteína total fue determinada y el jugo gástrico fue almacenado en alícuotas pequeñas a -70°C .

Las VMVA fueron preparadas con el método de precipitación diferencial con MgCl_2 como fue reportado por Wolfersberger y cols. (1987), con un paso final de diálisis contra 400 volúmenes de KCl 150 mM, HEPES-HCl 10 mM, pH 7.4 (Sigma, St. Louis, MO). El contenido de proteína en las VMVA fue ensayado con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma, St. Louis, MO) en presencia de SDS 0.75%. El enriquecimiento de las VMVA fue estimado de acuerdo a la proporción de las actividades de fosfatasa alcalina (FA), aminopeptidasa N (APN) y citocromo *c* oxidasa, relativo al homogenizado inicial (7-10 veces de incremento de FA y APN/mg proteína). La actividad de citocromo *c* oxidasa fue determinada para comprobar que las VMVA no estuvieran contaminadas con membrana mitocondrial. Esta actividad fue ensayada con la forma reducida del citocromo *c* de corazón de caballo como sustrato, en un espectrofotómetro SIM Aminco DW-2000 de doble rayo (García-Soto *et al.*, 1988). La actividad de APN fue ensayada usando la L-leucina-*p*-nitroanilida como sustrato (Lorence *et al.*, 1997) y la de FA con *p*-nitrofenil fosfato (Harlow and Lane, 1988).

Las vesículas pequeñas unilamelares (vpu) fueron preparadas con fosfatidilcolina (FC) y colesterol (C) (Avanti Polar Lipids, Co) a relaciones molares (FC:C) de 10:1, 5:1 y 1:1. Para ello, un mg total de lípido en cloroformo fue secado bajo corriente de nitrógeno hasta formar una monocapa en el fondo de un tubo de vidrio. La monocapa fue suspendida en 1 ml del amortiguador requerido y sonicada tres ciclos, de un minuto cada uno, en baño de agua-hielo. Con el fin de evitar la oxidación, los lípidos fueron manejados y almacenados bajo atmósfera de nitrógeno y las soluciones siempre fueron desgasificadas y sometidas a burbujeo de nitrógeno.

4.5 Secuencia de extremos N-terminales

La toxina Cry1Ab fue digerida con jugo gástrico de *M. sexta*, separada en SDS-PAGE 10% y transferida a una membrana de PDVF Immobilon-P^{SO} (Millipore Co., Bedford, MA), en una cámara de transferencia semiseca. La proteína fue teñida con el colorante Ponceau S 0.1% (Sigma, St. Louis, MO) y las bandas seleccionadas fueron cortadas para la

secuenciación del extremo N-terminal en el 6400/6600 Milligen/Biosearch Prosequencer en el Instituto de Biotecnología-UNAM.

4.6 Cromatografía de exclusión molecular y de intercambio iónico

La toxina Cry1Ab, obtenida por digestión con tripsina o jugo gástrico de *M. sexta*, fue separada mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) o mediante cromatografía de intercambio iónico en columna HiTrap Q (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) como se describió anteriormente (Güereca and Bravo, 1999). Las toxinas eluidas fueron analizadas en SDS-PAGE 10%, transferidas a membranas de nitrocelulosa, detectadas con un anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab (1/10,000; 1 h) que a su vez fue detectado con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Sigma, St. Louis, MO) (1/1000; 1 h), y visualizadas por incubación con el sustrato quimioluminiscente SuperSignal (Pierce, Rockford, IL), siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de la cromatografía de intercambio iónico, el dominio I fue detectado con el anticuerpo monoclonal 4D6 (1/5,000; 1h), el cual reconoce los aminoácidos 164-222 de Cry1Ab (Höfte *et al.*, 1988) y un anticuerpo anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (Sigma, St. Louis, MO) (1/1000; 1 h).

4.7 Ensayos de unión y de inserción

Las protoxinas digeridas con tripsina o con jugo gástrico fueron ensayadas por su capacidad de unirse a VMVA, como se reportó previamente (Aranda *et al.*, 1996). Veinte µg de proteína de VMVA fueron incubadas con la toxina Cry1Ab a concentración final de 10 nM en 100 µl de amortiguador de unión (PBS, BSA 0.1% w/v, Tween-20 0.1% v/v, pH 7.6) por 1 h. La toxina no unida fue removida por centrifugación (10 minutos a 14,000 x g) y la pastilla, conteniendo las VMVA, fue lavada dos veces con el mismo amortiguador (500 µl). Finalmente, las VMVA fueron suspendidas en 10 µl de PBS, pH 7.6, y un volumen igual del amortiguador de carga de Laemmli 2X. Las muestras fueron hervidas por 5 minutos, separadas por SDS-PAGE 10%, y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa. La toxina Cry1Ab que permaneció unida a las vesículas fue detectada con el anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab en ensayos de Western blot, como se describió arriba.

La inserción de la toxina Cry1Ab en membranas sin receptor fue ensayada incubando

un mg de vesículas pequeñas unilamelares (vpu) con toxina 4 μ M por 1 h a temperatura ambiente. Las variables experimentales evaluadas fueron el pH, la fuerza iónica y la relación molar FC:C. Adicionalmente, se evaluó la posibilidad de forzar la incorporación de la toxina durante la preparación de las vpu y por sonicación. En el primer caso, se procedió a preparar las vpu en presencia de la toxina Cry1Ab 4 μ M, con o sin alquilglucósido a una concentración mayor que la concentración micelar crítica ($C_f = 60$ mM). Cuando se usó alquilglucósido, el detergente fue removido por diálisis extensiva contra Tris-HCl 50 mM con o sin 100 mM de NaCl a 4°C.

La inserción de Cry1Ab en membranas con receptor, fue ensayada incubando la toxina marcada con FITC con vesículas de la microvellosidad apical (VMVA) de *M. sexta* en las siguientes situaciones experimentales: a) se mantuvo la concentración de VMVA (40 μ g/100 μ l) y se aumentó la concentración de toxina (20-400 nM) y b) se mantuvo constante la concentración de toxina (200 nM) y se aumentó la de VMVA (5-400 μ g). Todas las incubaciones se realizaron en oscuridad y a temperatura ambiente durante dos horas.

En cada caso, las vesículas fueron sedimentadas por centrifugación a 100,000 x g y lavadas para remover la toxina no unida. La presencia de toxina en la pastilla y sobrenadante fue monitoreada espectrofluorométricamente como se describe adelante.

4.8 Mediciones de fluorescencia

Los espectros de emisión de la fluorescencia intrínseca de la toxina Cry1Ab fueron obtenidos excitando la muestra, contenida en una celda de cuarzo de 700 μ l y 1 cm de longitud de paso de luz, a 280 nm y registrando la emisión en el rango de 300 a 400 nm. La fluorescencia del FITC fue registrada excitando la muestra a 494 nm y obteniendo la emisión de 500 a 600 nm en un espectrofluorómetro AMINCO AB2.

Los efectos de solvente de la fluorescencia del FITC fueron analizados de acuerdo a la teoría de Lippert (Lackowicz, 1983). Los ensayos de apagamiento de la fluorescencia intrínseca de Cry1Ab con yoduro y con acrilamida, fueron realizados incubando la proteína con concentraciones crecientes (0 a 0.5 M) de los agentes apagadores y manteniendo el volumen total constante. El apagamiento máximo se determinó mediante el apagamiento de la fluorescencia de L-triptofano en solución acuosa. Cuando se usó yoduro como agente apagador, la excitación fue realizada a 290 nm. Los espectros de emisión fueron analizados

con la ecuación de Stern-Volmer para el apagamiento bimolecular de la fluorescencia (Lackowicz, 1983). La exposición de los residuos de triptofano se determinó mediante el apagamiento de la fluorescencia intrínseca con yoduro y se comparó con la esperada a partir del modelo de estructura terciaria de Cry1Ab.

La actividad de formación de poro fue ensayada mediante el monitoreo de los cambios en el potencial de membrana con el colorante fluorescente cargado positivamente, 3,3'-dipropiltiodicarbocianina (Dis-C₃-(5), Molecular Probes, Eugene, OR) como se describió previamente (Lorence *et al.*, 1995). La fluorescencia se registró a 620/670 nm (excitación/emisión) en un sistema Hansatech (Norfolk, England). Una hiperpolarización provoca la internalización del colorante en las VMVA y una disminución en la fluorescencia. Una depolarización causa el efecto opuesto. Las VMVA (10 µg) previamente cargadas con KCl 150 mM fueron suspendidas en 900 µl de cloruro de *N*-metil-D-glucamina (MeGluCl) 150 mM, HEPES-HCl 10 mM, pH 9. Cuando el colorante llegó al equilibrio (2 minutos), se adicionó Cry1Ab a concentración final de 50 nM. Los cambios en el potencial de membrana fueron monitoreados mediante adiciones sucesivas de KCl (7, 22, 47, 98 y 195 mM) a la suspensión de VMVA (Fig. 8). Aquí, se reportan los análisis de las pendientes (*m*) de las curvas de los cambios en la fluorescencia (ΔF) (%) vs. el potencial de equilibrio del K⁺ (E_K^+) (mV). E_K^+ fue calculado con la ecuación de Nernst (Hille, 1992). Las determinaciones del potencial de membrana fueron realizadas 4 veces.

4.9 Bioensayos

La actividad de las toxinas, obtenidas por digestión de la protoxina Cry1Ab con jugo gástrico o con tripsina, fue ensayada contra larvas de primer instar de *M. sexta*. Para ello, se procedió a aplicar un volumen constante de la dilución de la muestra (35 µl) sobre la superficie de la dieta contenida en placas de poliestireno de 24 pozos (Cell Wells, Corning Glass Works, Corning New York 14831). Una larva de primer instar fue adicionada por pozo y una placa de 24 pozos fue usada por cada concentración de toxina. Las placas fueron incubadas a 28°C, 65±5% de humedad relativa, y un fotoperiodo de luz:oscuridad de 16:8 h. La mortalidad fue registrada después de 7 días. En los casos en que se determinó la LC₅₀, los resultados de mortalidad fueron analizados con el programa Probit y los resultados se muestran con sus respectivos límites de confianza al 95%.

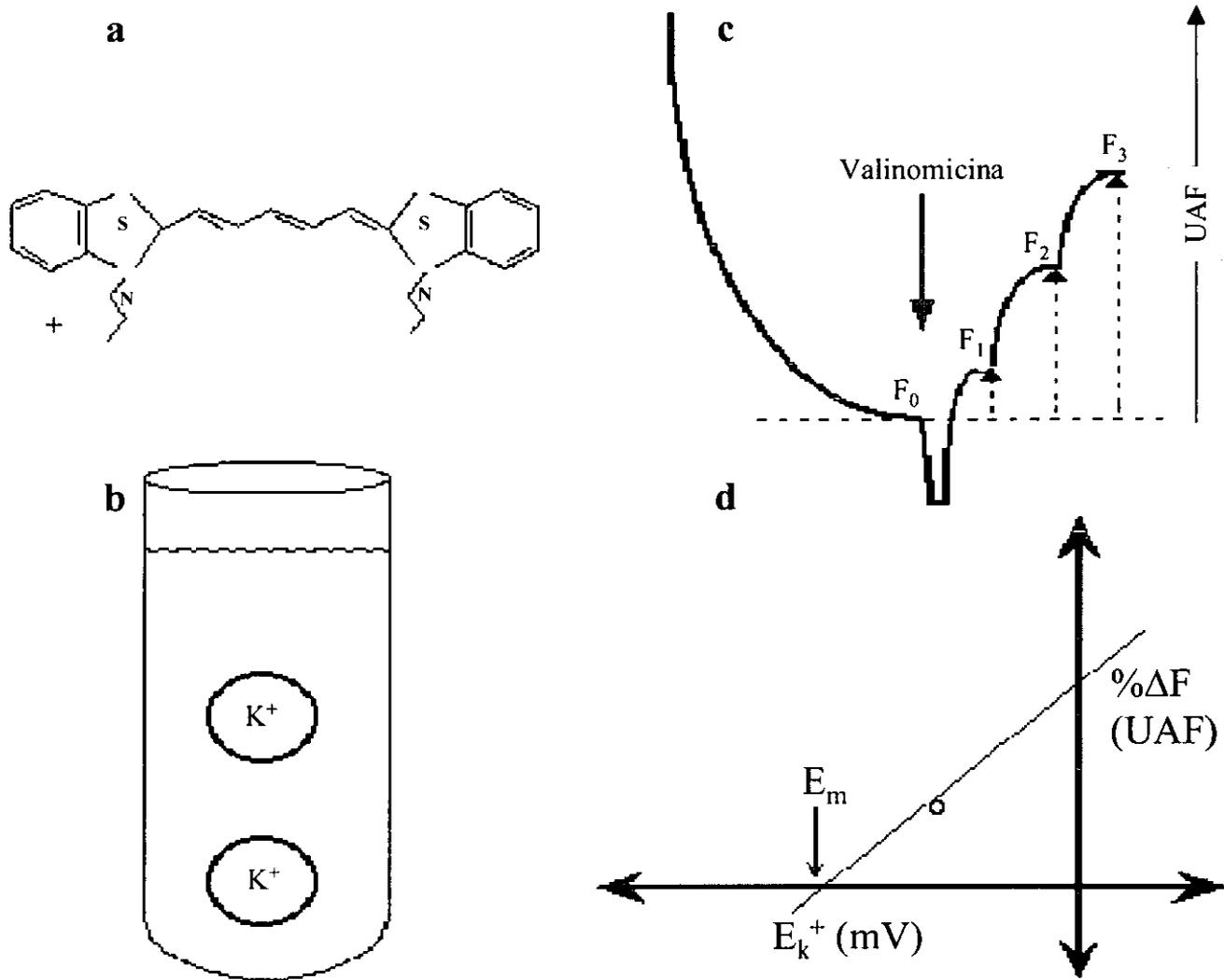


Figura 8. Ensayos de permeabilidad de K⁺. a) 1.5 mM del colorante fluorescente (Dis-C₃(5)), el cual es sensible a cambios en el potencial de membrana, es adicionado a b) 20 μg de VMVA cargadas previamente con KCl 150 mM, EGTA 2 mM, EDTA 0.5 mM, HEPES-HCl 10 mM, pH 7.5 y suspendidas en MeGluCl 150 mM, pH 9. c) En estas condiciones el colorante se introduce a las vesículas hasta que llega al equilibrio (2 minutos), indicado por F₀. Cuando el colorante se encuentra en las vesículas se apaga su fluorescencia por lo que se observa una disminución en su emisión (excitación a 620 nm, emisión a 670 nm). Un aumento de la fluorescencia indica una depolarización en el potencial de membrana, el efecto opuesto indica una hiperpolarización. La apertura de una vía de permeabilidad por adición de valinomicina o toxina, provoca una hiperpolarización. La posterior adición de KCl al medio externo, indicado por F₁, F₂, F₃,...F_n provoca una depolarización que provoca la salida del colorante y es registrada por un respectivo aumento de la fluorescencia. Los cambios en la fluorescencia son obtenidos mediante la ecuación $\Delta F = 100 (F_n - F_0)/F_0$. Para cada adición de KCl se calcula el potencial de equilibrio de K⁺ con la ecuación de Nernst $E_{K^+} = RT/F \cdot \ln ([K]_e/[K]_i)$, siendo R, la constante general del estado gaseoso; T, la temperatura absoluta; F, la constante de Faraday; [K]_e y [K]_i, las concentraciones externas e internas de K⁺. d) Con ΔF y E_{K⁺} se construye una gráfica cuya pendiente (m) representa la permeabilidad de K⁺ inducida por la toxina en las VMVA.

5. RESULTADOS

A continuación se describen los resultados obtenidos en el presente trabajo. Estos han sido divididos en dos secciones. La primera sección corresponde al análisis fluorescente de la toxina Cry1Ab. La segunda sección, parte de la cual fue aceptada para publicación en la revista *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (ver anexo), está dedicada al procesamiento proteolítico y su papel en la activación y degradación de la toxina Cry1Ab.

5.1 Estudios fluorescentes de la toxina Cry1Ab

5.1.1. Análisis de la estructura de la toxina Cry1Ab por su fluorescencia intrínseca

Bajo el supuesto de que las toxinas Cry deben sufrir cambios en su estructura para pasar de un ambiente hidrofílico a otro hidrofóbico, como es el caso de una membrana biológica, el primer objetivo planteado para este trabajo, fue realizar el análisis de los cambios conformacionales de la toxina Cry1Ab cuando se inserta en la membrana. Para ello, se escogió una metodología que implica el uso de las propiedades espectroscópicas de la fluorescencia.

La fluorescencia intrínseca de las proteínas corresponde principalmente a la fluorescencia de los residuos de triptofano. La toxina Cry1Ab tiene 9 residuos de triptofano de los cuales 7 se encuentran en el dominio I y los 2 restantes en el dominio II. El espectro de emisión de la fluorescencia intrínseca de la toxina Cry1Ab tiene un máximo a 345 nm. En comparación, el espectro de emisión del L-triptofano en solución tiene un pico a 360 nm (Fig. 9). Debido a que la emisión del triptofano responde al comportamiento de Lippert, el cual está relacionado a la polaridad del ambiente, este corrimiento, hacia longitudes de onda más cortas, indica que una proporción de los triptofanos se encuentran embebidos en el interior hidrofóbico de la proteína.

Para caracterizar más detalladamente la exposición de los residuos de triptofano de la toxina Cry1Ab al solvente, se realizaron experimentos de apagamiento de la fluorescencia intrínseca en presencia de agentes como acrilamida e ioduro. La acrilamida es capaz de difundir de ambientes hidrofílicos a hidrofóbicos. Con acrilamida 0.1 M se observó un apagamiento del 50% de la emisión respecto a la fluorescencia inicial, y a 0.5 M se observó

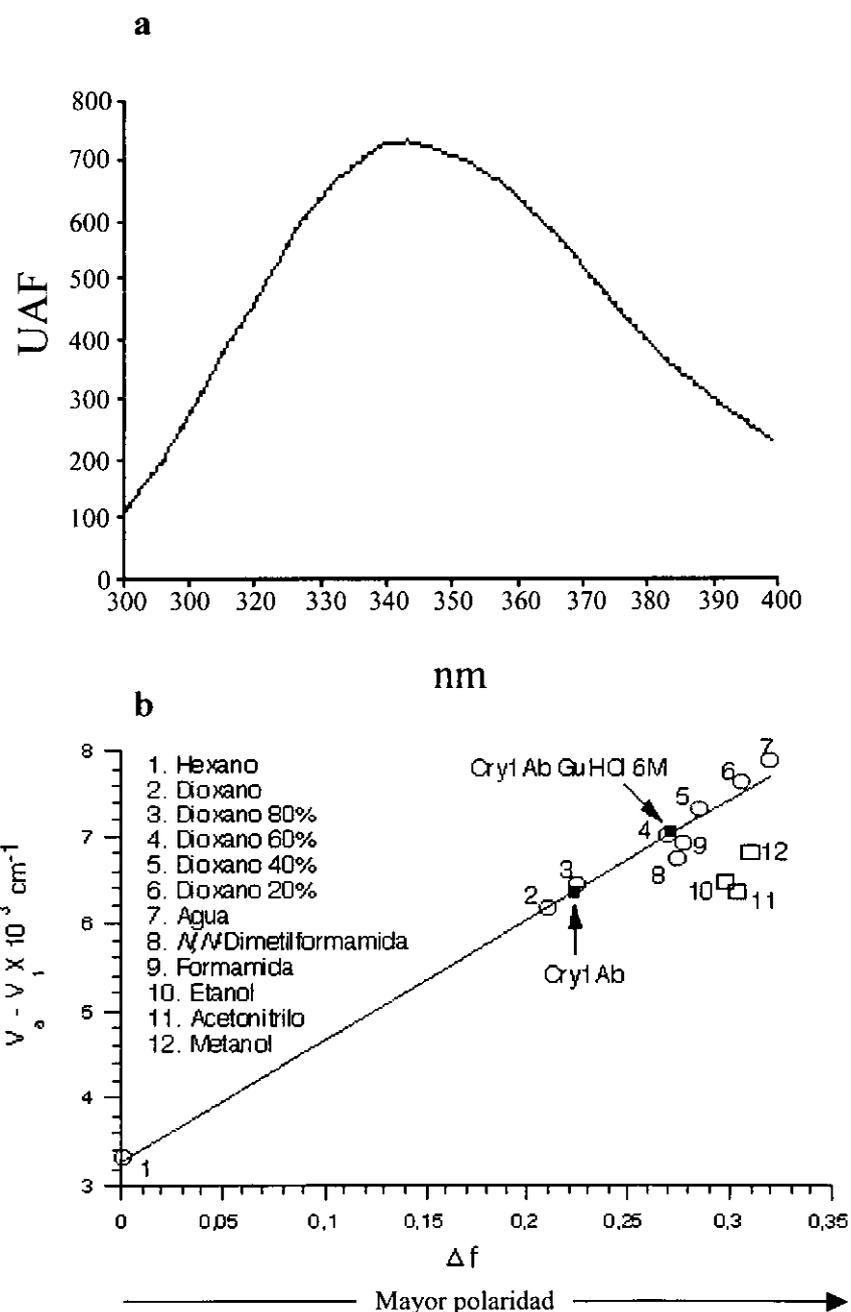


Figura 9. Fluorescencia intrínseca de Cry1Ab. a) Espectro de emisión. La toxina (10 nM) fue excitada a 280 nm y la emisión de fluorescencia fue registrada entre 300 y 400 nm. El pico de emisión a 345 nm indica que parte de los triptofanos se encuentran en un ambiente hidrofóbico. b) Efecto de solventes sobre la emisión del L-triptofano. El coeficiente de polarizabilidad, Δf , depende de la polaridad, del índice de refracción y de la constante dieléctrica del solvente en el que se encuentra el fluoróforo. El corrimiento del pico de emisión (corrimiento de Stoke), $V_a - V_p$ es la diferencia entre el número de onda del pico de absorción y el de emisión.

un apagamiento del 85% (Fig. 10a). A medida que se incrementó la concentración de acrilamida, el pico de emisión se corrió hasta 5 nm hacia longitudes de onda más cortas. Estos resultados indican que aunque la acrilamida es capaz de difundir hasta el interior hidrofóbico de la proteína, los residuos de triptofano más expuestos al solvente fueron los primeros en ser apagados. El yoduro, a concentraciones tan altas como 0.5 M apagó menos del 50% de la fluorescencia intrínseca de la proteína (Fig. 10b). A medida que se aumentó la concentración de este ión, el pico de emisión de fluorescencia se corrió gradualmente hacia longitudes de onda más cortas. El total del corrimiento fue de 10 nm, lo que indica que sólo los residuos de triptofano localizados dentro del interior hidrofóbico de la proteína continuaron emitiendo fluorescencia. Cuando la toxina fue desnaturalizada con 6M de hidrocloreuro de guanidina (Fig. 10c), la fluorescencia intrínseca fue apagada más eficientemente dado que los triptofanos se encuentran más accesibles al solvente y en consecuencia al yoduro. A medida que se aumentó la concentración del ión se observó un corrimiento espectral hacia el azul de hasta 8 nm. Los espectros de emisión fueron analizados mediante la ecuación de Stern-Volmer para el apagamiento colisional de la fluorescencia (Fig. 10d y e). La pendiente de las líneas representa la constante de apagamiento bimolecular (K_{SV}), la cual está implicada en la eficiencia con que el fluoróforo es apagado. Resulta notable que en comparación con el apagamiento por yoduro del L-Trp en solución, la K_{SV} de la toxina Cry1Ab es 4 veces menor (Fig. 10e). En contraste, la K_{SV} de la toxina desnaturalizada con hidrocloreuro de guanidina no difiere considerablemente de la del L-triptofano.

Por otra parte, se determinó gráficamente el porcentaje de los triptofanos de la proteína que se encuentran expuestos al solvente (Fig. 11a). Para las toxinas nativa y desnaturalizada se obtuvo que el 69% y el 95% de los triptofanos se encuentran accesibles, respectivamente. Según un modelo estructural de la toxina Cry1Ab generado por computadora, a partir de las coordenadas cristalográficas de Cry1Aa, el porcentaje de exposición para la toxina nativa se desvía sólo ligeramente del esperado (57 % de exposición, Fig. 11b). La desviación entre exposición observada y esperada podría ser explicada debido a que estos experimentos son afectados por la dinámica de movimiento de la proteína. Por otra parte, el porcentaje de exposición de la toxina tratada con hidrocloreuro de guanidina, indica que la estructura se desnaturalizó lo suficiente como para permitir el

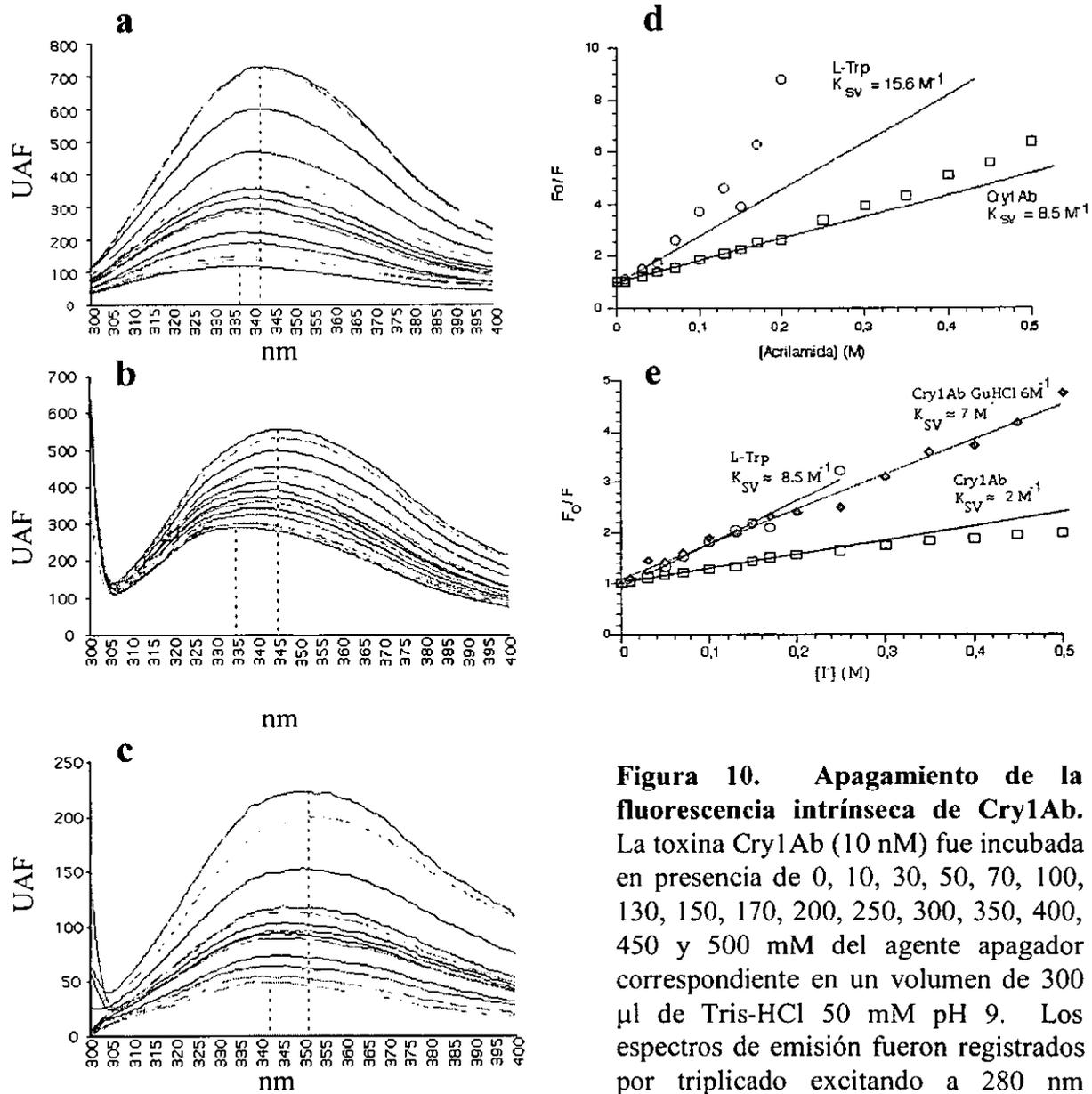


Figura 10. Apagamiento de la fluorescencia intrínseca de Cry1Ab. La toxina Cry1Ab (10 nM) fue incubada en presencia de 0, 10, 30, 50, 70, 100, 130, 150, 170, 200, 250, 300, 350, 400, 450 y 500 mM del agente apagador correspondiente en un volumen de 300 μl de Tris-HCl 50 mM pH 9. Los espectros de emisión fueron registrados por triplicado excitando a 280 nm cuando se usó acrilamida como agente

apagador (a) y a 290 nm cuando se usó ioduro de potasio (b y c). En los experimentos de apagamiento con ioduro, la fuerza iónica se mantuvo constante mediante la adición de KCl. $[\text{KI}] + [\text{KCl}] = 500 \text{ mM}$. El corrimiento máximo en los espectros de emisión es indicado mediante líneas verticales. La intensidad de fluorescencia de los espectros de emisión fue utilizada para construir una gráfica de apagamiento mediante la ecuación de Stern-Volmer ($F_0/F = 1 + K_{SV} [Q]$) para la acrilamida (d) y para el ioduro (e). En la ecuación, F_0 y F son la fluorescencia en ausencia y presencia del agente apagador, K_{SV} indica la constante de apagamiento y $[Q]$ es la concentración del apagador. Como parámetro de comparación se analizó el apagamiento del L-triptofano en fase acuosa.

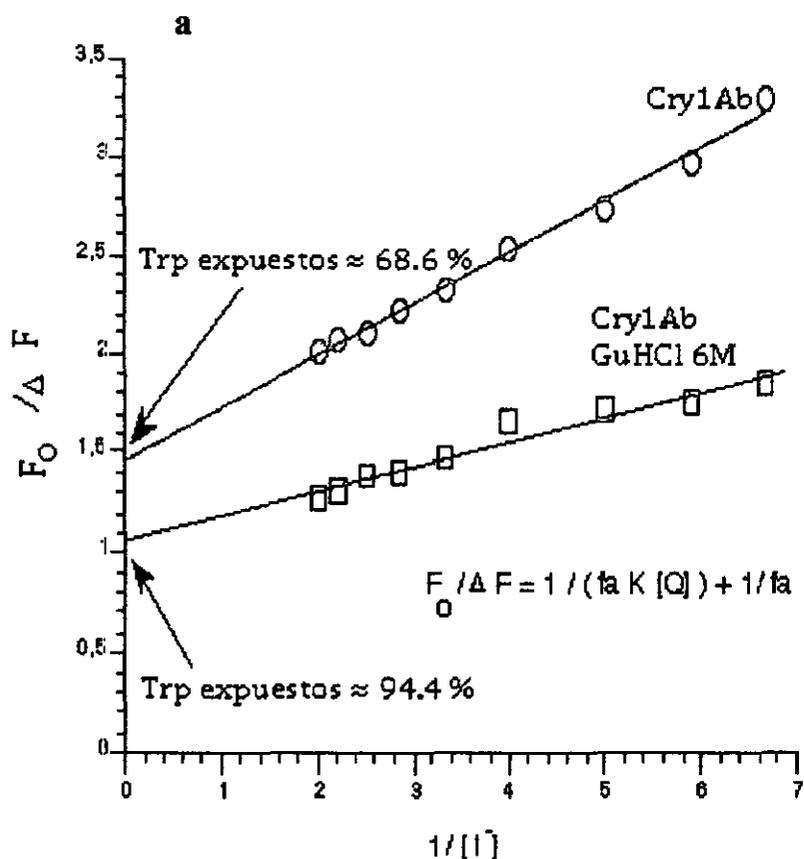


Figura 11. Exposición de los triptofanos de Cry1Ab al solvente. a) La intensidad de fluorescencia de los espectros de emisión de la Figura 10b y 10c fue utilizada para la determinación gráfica de los porcentajes de exposición de los triptofanos en la toxina Cry1Ab nativa y desnaturalizada con hidrocloreuro de guanidina 6M. Para ello se utilizó la ecuación $F_0/\Delta F = 1/(f_a K [Q]) + 1/f_a$, una forma modificada de la ecuación de Stern-Volmer. F_0 es la fluorescencia en ausencia de agente apagador, ΔF es igual a $F_0 - F$ (F = fluorescencia en presencia de apagador), K es la constante de Stern-Volmer de la fracción de triptofanos accesibles y f_a es la fracción de la fluorescencia inicial que es accesible al agente apagador. En la gráfica, f_a^{-1} es el intercepto en el eje y (Lackowicz, 1983). b) Modelo tridimensional de la toxina Cry1Ab generado con las coordenadas cristalográficas de Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995). Los residuos de triptofano se representan en color violeta. La exposición de los residuos de triptofano se calculó con el algoritmo de Conolly en el programa InsightII. Se calculó que el 57% de los residuos de triptofano se encuentran expuestos total o parcialmente al solvente.

acceso del yoduro hasta alcanzar a la mayor parte de los triptofanos. Debido a que la mayoría de los triptofanos se encuentran en el dominio I, es posible inferir que en estas condiciones, al menos el dominio I perdió su estructura.

5.1.2. Inserción de la toxina Cry1Ab en membranas modelo

El uso de agentes apagadores como el yoduro y la acrilamida ha demostrado ser útil para el estudio de la localización de los residuos de triptofano de proteínas integrales de membrana. En este trabajo se realizaron experimentos para tratar de incorporar la toxina Cry1Ab en vesículas pequeñas unilamelares (vpu). Para ello, se exploraron las siguientes variables: pH (8 a 10.5 en intervalos de 0.5), concentración de NaCl (0, 100 y 200 mM), composición lipídica (fosfatidilcolina/colesterol, en relaciones molares de 10:1, 5:1, 1:1) y el uso de un detergente no iónico como el alquilglucósido.

1 mg de vpu fue incubado en presencia de toxina Cry1Ab a concentración final de 4 μ M a temperatura ambiente. Después de 1 hora, la suspensión fue centrifugada a 100,000 x g y la pastilla fue separada del sobrenadante. Ambas fracciones fueron analizadas para detectar la fluorescencia intrínseca de la proteína existente en cada fracción. En ningún caso se observó fluorescencia asociada a las vpu (pastilla), mientras que el total de la proteína quedó en el sobrenadante (Fig. 12).

En otra serie experimental, se intentó forzar la incorporación de la toxina durante la preparación de las vpu. Para esto, se mezclaron los lípidos y la toxina en cloroformo y se secaron en corriente de nitrógeno hasta formar la monocapa, para posteriormente suspenderlos en fase acuosa. El análisis de la fluorescencia intrínseca indicó que en estas condiciones, la toxina tampoco se incorporó a la membrana.

El uso de detergentes no iónicos tales como el alquilglucopiranosido ha permitido la reconstitución de muchas proteínas en membranas modelo. Por ello, y con el fin de incorporar la toxina Cry1Ab en la bicapa de vpu, se realizaron experimentos utilizando este detergente a una concentración mayor que la concentración micelar crítica, en la cual el lípido se mantiene en forma soluble. Al remover el detergente por diálisis, hasta alcanzar una concentración igual o menor que la concentración micelar crítica, las moléculas de lípido salen de la solución y se organizan en bicapas. El uso de este detergente tampoco resultó en la incorporación de la toxina.

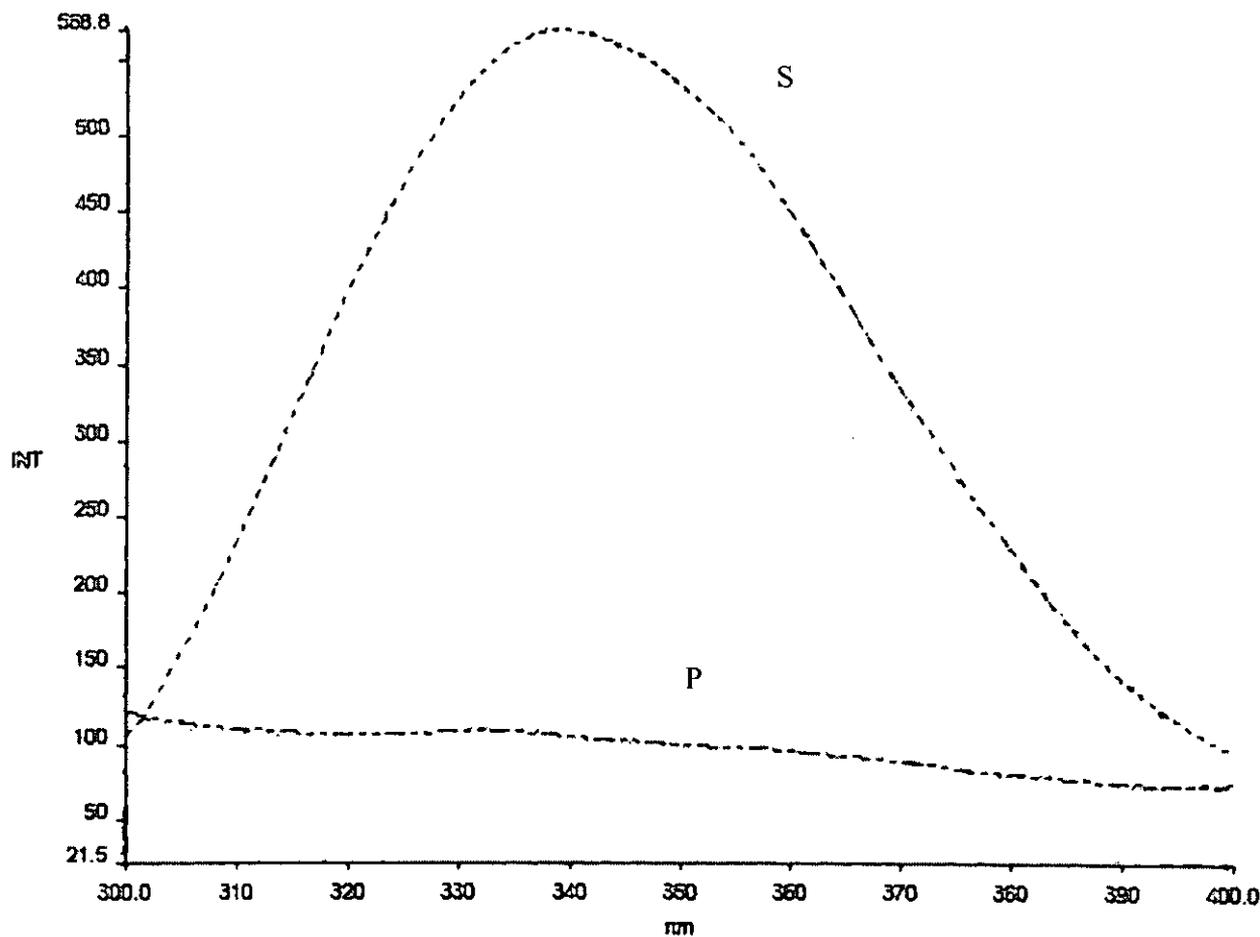


Figura 12. Interacción de la toxina Cry1Ab con membranas sintéticas. La toxina (4 μ M) fue incubada por 1 h con vesículas pequeñas unilamelares preparadas con fosfatidilcolina:colesterol (10:1, 5:1 o 1:1) en amortiguadores conteniendo diferentes pH (8-10.5 en intervalos de 0.5) y/o fuerza iónica (0, 100 y 200 mM de NaCl). Alternativamente, las vesículas fueron preparadas en presencia de la toxina utilizando alquilglucopiranosido. Las vesículas fueron ultracentrifugadas a 100,000 x g y se analizó la fluorescencia de la pastilla que contiene las vesículas (P) y del sobrenadante, en el cual se quedó la proteína no unida (S).

En estos experimentos, tanto la calidad de las membranas como la ausencia de receptor pudieron haber sido factores importantes en la baja o nula incorporación de la toxina a las membranas modelo.

5.1.3. Uso de sondas fluorescentes extrínsecas para el estudio de la estructura de la toxina Cry1Ab

Con el objeto de intentar insertar la toxina en membranas naturales que contienen receptor, se decidió marcar fluorescentemente a la toxina Cry1Ab con fluoresceína isotiocianato (FITC). Este fluoróforo reacciona específicamente con el grupo ϵ -amino de las lisinas. La toxina Cry1Ab tiene sólo tres lisinas, localizadas en las posiciones 403, 478 y 490. En un alineamiento de 79 secuencias Cry se encontró que el residuo K478 está altamente conservado (86 %), el K490 se conserva en 48% mientras que el residuo K403 es más variable (24% de conservación).

La toxina Cry1Ab, obtenida por digestión con tripsina, fue purificada mediante cromatografía de intercambio iónico y posteriormente marcada con FITC. La sonda libre fue separada de la sonda unida a la proteína mediante filtración en gel con sephadex G25. La toxina marcada fue analizada por Western blot con un anticuerpo monoclonal α -FITC conjugado con fosfatasa alcalina. Por otro lado, la estequiometría del marcaje fue determinada mediante la obtención de espectros de absorción desde 250 hasta 550 nm. Los valores a 280 y 495 nm fueron utilizados para calcular las concentraciones de proteína y de FITC, respectivamente. Para ello, se consideraron los coeficientes de extinción molar del FITC y de la toxina (ver material y métodos).

Con el objeto de encontrar la condición en que sólo se marque un sitio de lisina en la proteína, se procedió a realizar reacciones de marcaje a diferentes relaciones molares FITC/toxina. Sin embargo, aun con excesos molares de 200X, el marcaje fue marginal (0.5 FITC/toxina). Esto contrasta fuertemente con el modelo estructural de la toxina Cry1Ab, en el cual los residuos K403 y K490 se encuentran expuestos en la superficie de la proteína, mientras que el residuo K478 se encuentra en el centro hidrofóbico.

5.1.4. La agregación de la toxina Cry1Ab impide su marcaje con FITC

Es posible que el modelo estructural no correspondiera a la verdadera estructura de la toxina. Sin embargo, esto es poco probable debido a que a nivel de estructura primaria, Cry1Ab es más de 90% idéntico a la toxina cristalizada Cry1Aa. En este sentido, cabe recordar que a pesar de que la identidad entre las secuencias de Cry1Aa y Cry3Aa es de sólo 36% de identidad, tienen un extraordinario parecido estructural. Otra explicación podría estar relacionada con un impedimento estérico del marcaje, debido al estado de agregación de las moléculas de toxina. Aun cuando no se ha estudiado este fenómeno desde un punto de vista cinético, es frecuente observar que la toxina Cry1Ab purificada y almacenada a 4°C por periodos menores a una semana, se agrega hasta formar precipitados. Esta precipitación se inhibe mediante el incremento de la fuerza iónica y/o manteniendo la concentración de la proteína a menos de 1 mg/ml. Sin embargo, como se encontró mediante ensayos de cromatografía de exclusión molecular y electroforesis en geles nativos, en estas condiciones existen agregados de más de 10 moléculas de toxina (Güereca and Bravo, 1999). En este sentido, dado que se espera que la formación de agregados sea una función del tiempo, y que la agregación es el factor que impide el marcaje de la toxina Cry1Ab con FITC, se procedió a minimizar el periodo de tiempo entre la activación y el marcaje. Así, la toxina recién activada, purificada por intercambio iónico, marcada con FITC y purificada por exclusión molecular, se mantiene como un monómero. En estas condiciones, el marcaje fluorescente con un exceso molar de 30X fue exitoso (2FITC/Toxina).

Para determinar el número de sitios que pueden ser marcados, se hicieron reacciones a diferentes relaciones molares FITC/Toxina y se obtuvo la estequiometría de marcaje para cada una (Fig. 13). La estequiometría de marcaje para Cry1Ab fue de 2:1 como era de esperarse según el modelo de estructura terciaria para esta proteína. El FITC acoplado a la toxina fue detectado con un anticuerpo anti-FITC, conjugado a fosfatasa alcalina en un ensayo de inmunotransferencia (Fig. 13b, inserto).

Debido a que, para el estudio espectroscópico de la interacción de la toxina con las membranas de la microvellosidad apical de *M. sexta*, es necesario contar con la posibilidad de marcar en un sólo sitio y, de esta forma, conocer la localización de la sonda, se generaron mutantes del gen *cry1Ab* en las que se removieron secuencialmente los residuos

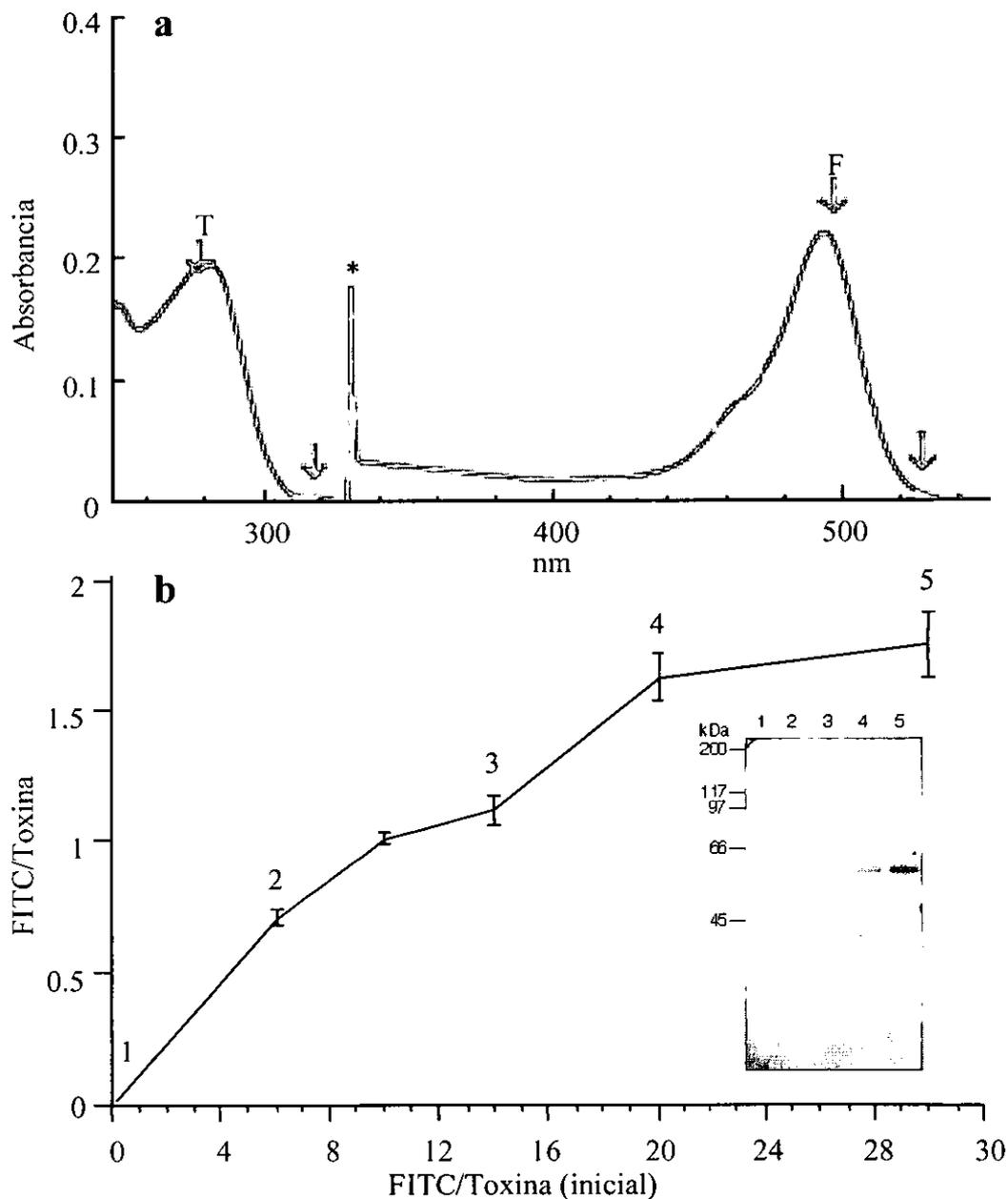


Figura 13. Marcaje de la toxina Cry1Ab con FITC. La toxina Cry1Ab recién activada y purificada fue incubada por 16 h con fluoresceína isotiocianato (FITC), a diferentes relaciones molares en buffer de boratos 50 mM pH 9. Posteriormente, la sonda no unida fue removida por cromatografía de exclusión molecular en una columna de sephadex G-25 equilibrada en el mismo buffer. Todo el proceso fue realizado en oscuridad y a temperatura ambiente. a) La estequiometría del marcaje fue determinada mediante análisis espectrofotométrico para lo cual se utilizaron los coeficientes de extinción molar de la toxina (pico T) ($E_{280} = 78,626 \text{ M}^{-1}$) y del FITC (pico F) ($E_{495} = 76,000 \text{ M}^{-1}$). La absorción del FITC a 280 nm es el 40% de la absorción a 495 nm (Sepulveda-Becerra *et al.*, 1996). El asterisco señala el cambio de la lámpara UV a visible. b) Estequiometría de marcaje a diferentes relaciones iniciales de FITC:toxina. La inflexión en la curva significa que un sitio se marca más rápido. Inserto, la toxina marcada fue analizada por Western blot con un anticuerpo monoclonal anti-FITC conjugado con fosfatasa alcalina y visualizado con el sustrato cromogénico NBT y BCIP (de Maio, 1994).

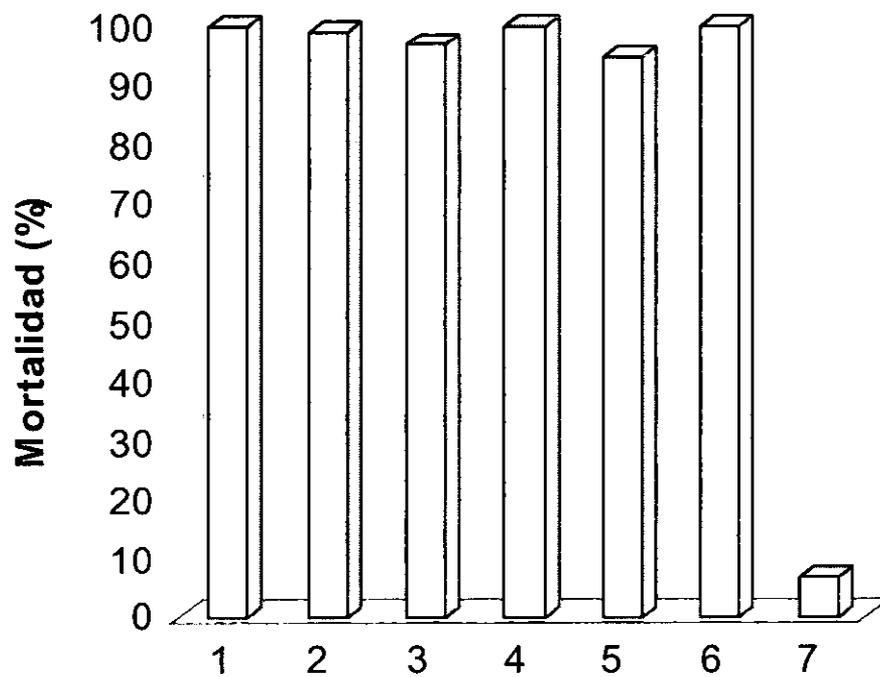


Figura 14. Actividad insecticida de las mutantes de lisina. La mutagénesis conservativa sitio dirigida para remover secuencialmente los residuos de lisina fue realizada como se reportó previamente (Meza *et al.*, 1996). Las mutantes se expresaron en la cepa *Bt407cry⁻* y no se encontraron diferencias en cristalización, solubilización ni procesamiento con tripsina respecto a la parental. La toxicidad contra larvas de primer instar de *M. sexta* fue determinada como % de mortalidad respecto a la toxina silvestre. Las larvas fueron retadas contra 20 ng/cm² de: 1, Cry1Ab silvestre; 2, K403R; 3, K478R; 4, K490R; 5, K403R-K478R; 6, K403R-K490R y 7, mortalidad espontánea como control negativo.

de lisina. Para ello se procedió con el método de mutagénesis sitio-dirigida con un protocolo de extensión de fragmentos traslapados, obtenidos por PCR mediante el uso de oligonucleótidos mutagénicos (Meza et al., 1996). La mutagénesis fue conservativa, intercambiando lisinas por argininas, para evitar al máximo la pérdida o alteración de función. Las mutantes K403R, K478R, K490R, K403R-K478R y K403R-K490R se expresaron como la parental y no se encontró ninguna diferencia en su solubilización ni activación. La actividad insecticida de las mutantes de lisina fue ensayada en larvas de primer instar de *M. sexta*. Como es posible observar en la Figura 14, ningún cambio alteró la toxicidad contra este insecto. Los resultados anteriores sugieren que los residuos de lisina no participan ni en la producción de la proteína ni en la estructura de la toxina Cry1Ab, ni en su actividad biológica.

5.1.5. Marcaje de las mutantes de lisina

La toxina Cry1Ab silvestre y la mutante K478R se marcaron en dos sitios, mientras que la mutante K490R se marcó sólo en uno (Fig. 15a). Por otra parte, cuando se cambió el residuo K403, en la mutante sencilla K403R ó doble K403R-K478R se encontró una estequiometría de marcaje menor de uno (Fig. 15a y b). En contraste, la doble mutante K403R-K490R se marcó muy pobremente. Estos datos validan el modelo de estructura terciaria de Cry1Ab, en el cual el residuo K478 se encuentra inmerso en el centro hidrofóbico de la proteína y por lo tanto inaccesible al solvente y en consecuencia también inaccesible al reactivo fluorescente (Fig. 15c). Analizando los resultados de marcaje, se encontró que el residuo K403 es el más accesible, seguido por el K490. Estos resultados indican que la mutante doble K403R-K490R puede ser utilizada para introducir residuos de lisina en otras regiones de la toxina y así marcar específicamente la proteína en otras posiciones.

Debido a que el marcaje fluorescente podría afectar la toxicidad de la proteína, se realizó un bioensayo con la toxina Cry1Ab silvestre, marcada 2:1 con FITC y sin marcar, contra larvas de primer instar de *M. sexta*. Los resultados muestran que el marcaje no altera la toxicidad de Cry1Ab (Tabla 2).

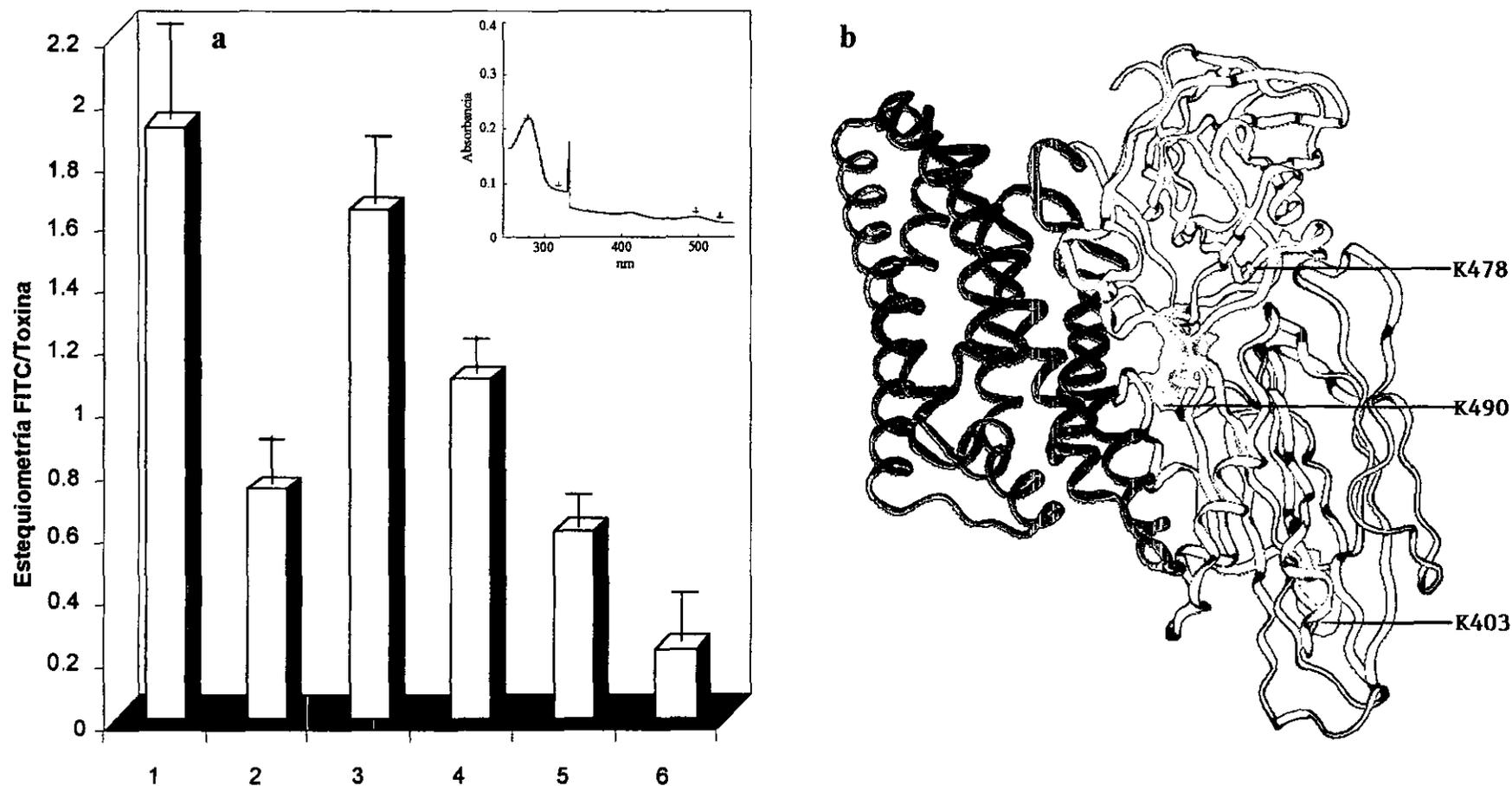


Figura 15. Estequiometría de marcaje de las mutantes de lisina con FITC. Las mutantes de lisina fueron marcadas como se explica en la Figura 13. a) Estequiometría de marcaje. 1, Cry1Ab silvestre; 2, K403R; 3, K478R; 4, K490R; 5, K403R-K478R y 6, K403R-K490R. Inserto: Espectro de absorción de la mutante K403R-K490R incubada por 26h con un exceso molar de FITC de 30:1. b) Modelo de estructura de la toxina Cry1Ab en el que se muestra la exposición de los residuo de lisina. Los residuos K403 y K490 se encuentran expuestos al solvente, mientras que el K478 se encuentra en el interior hidrofóbico de la proteína.

Tabla 2. Toxicidad de la toxina Cry1Ab marcada con FITC^a.

Toxina	CL ₅₀ ^b (ng/cm ²)	Límites al 95%
Cry1Ab	10.8	7.0 – 16.8
Cry1Ab-FITC ^c	8.1	4.9 – 13.2

^a Bioensayos contra larvas de primer instar de *Manduca sexta*. Se usó el método de alimentación por contaminación de la superficie de la dieta.

^b La CL₅₀ (concentración que mata al 50% de las larvas) fue obtenida con bioensayos a 5 concentraciones de toxina. Para cada concentración se usaron 24 larvas y se corrigió con la mortalidad no específica observada en larvas control que no fueron alimentadas con toxina.

^c Estequiometría de marcaje FITC:proteína de 2:1.

5.1.6. Interacción de la toxina Cry1Ab con vesículas de la microvellosidad apical (VMVA) de *M. sexta*

Con el fin de estudiar la inserción en membranas que contienen receptor, se procedió a incubar las toxinas marcadas con FITC con vesículas de la microvellosidad intestinal (VMVA) de *M. sexta*. En un experimento único, en el que se incubó la toxina Cry1Ab (100 nM), marcada con FITC (estequiometría FITC:proteína de 2:1), con 20, 40 y 60 µg de VMVA se observó un cambio en el espectro de emisión de 525 a 515 nm (Fig. 16a). Para entender este cambio se estudiaron los efectos de solvente para el FITC y se construyó una gráfica de Lippert (Fig. 16b). Sorprendentemente, esta sonda no sigue el comportamiento clásico de Lippert. En contraste, los cambios son inversos y tiene efectos específicos de solvente en ambientes polares. Klonis y Cols. (1998) describieron que el FITC responde más a efectos próticos que a la polaridad del ambiente. De esta forma, aunque resulta difícil explicar el cambio espectral de la toxina Cry1Ab marcada con fluoresceína en relación a la polaridad que rodea a la sonda, es posible que el FITC se encuentre más expuesto al ambiente polar y que, por lo tanto, esta región de la proteína no esté en contacto con la membrana. Sin embargo, el cambio observado involucra un cambio ambiental en la vecindad del fluoróforo, el cual podría ser utilizado para seguir la inserción de la toxina en las membranas.

Para estudiar sistemáticamente la interacción de la toxina con membranas, se realizaron experimentos en los que, a) se mantuvo la concentración de VMVA (40 µg/100 µl) y se aumentó la concentración de toxina marcada con FITC (20, 100, 200 y 400 nM) y b) se mantuvo constante la concentración de toxina-FITC (200 nM) y se aumentó la de VMVA (20, 40, 80, 200 y 120 µg). Todas las incubaciones se realizaron en oscuridad y a temperatura ambiente durante dos horas. Posteriormente, se centrifugaron a 100,000 x g por 1 h y se analizaron espectrofluorométricamente la pastilla, conteniendo las VMVA, y el sobrenadante, conteniendo la toxina no unida. En todos los casos se observó muy poca (1-3 %) fluorescencia asociada a las VMVA (Fig. 17). Mediante inmunotransferencia se detectó que una parte de la toxina marcada fluorescentemente estaba unida a las vesículas.

Dado que los ensayos de inserción de la toxina Cry1Ab en membranas modelo no fueron exitosos, de que la inserción en membranas obtenidas a partir de larvas de quinto instar de *M. sexta* fue muy pobre, y a que de forma sistemática hemos observado

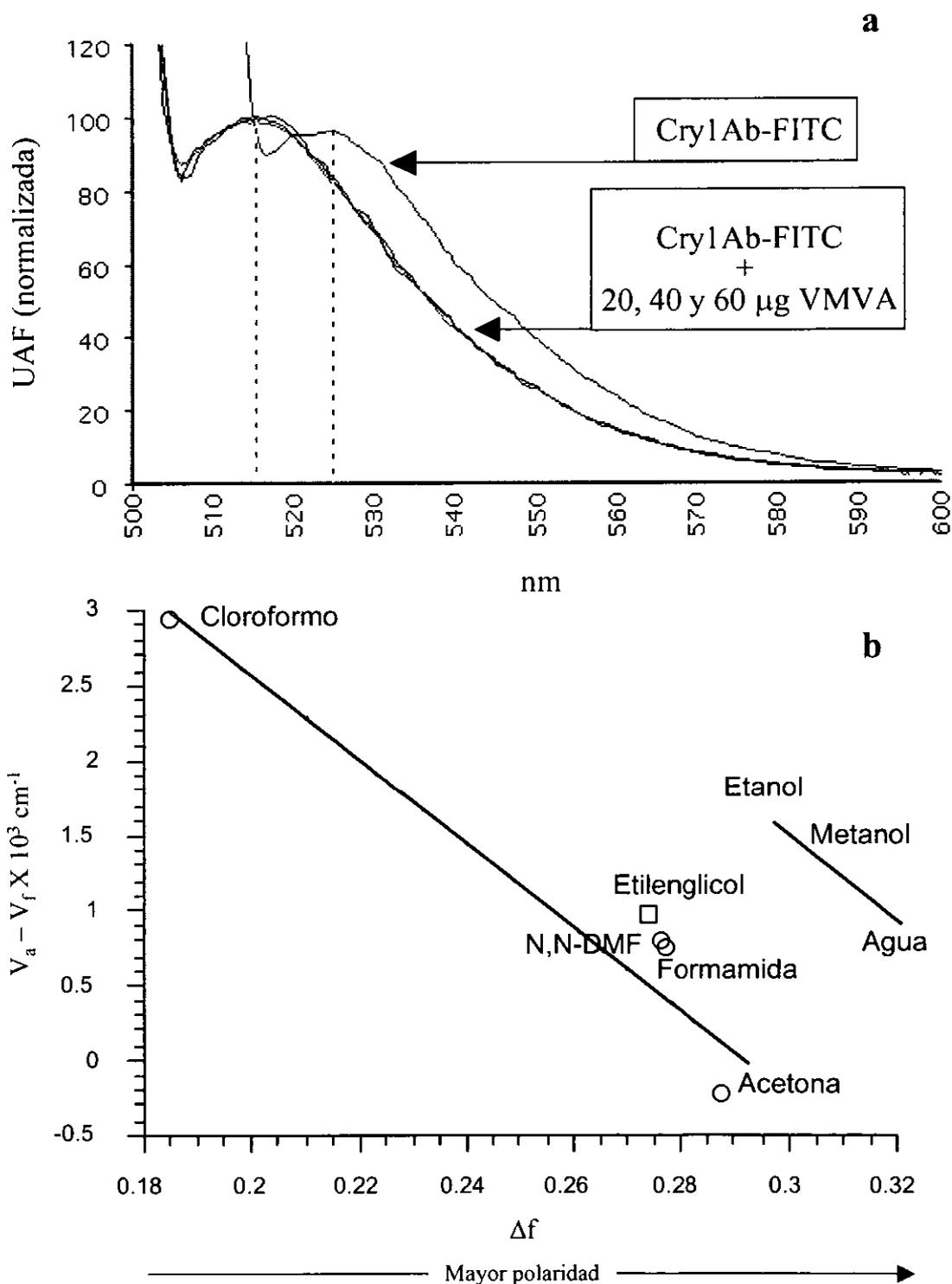


Figura 16. Interacción de la toxina Cry1Ab con VMVA. a) La toxina Cry1Ab (100 nM) marcada con FITC (estequiometría 2:1) fue incubada con 20, 40 y 60 µg de VMVA de *M. sexta*. Se obtuvieron los espectros de emisión de la toxina-FITC antes y después de la adición de vesículas. Los espectros de emisión en presencia de VMVA fueron corregidos mediante la resta de los espectros de las vesículas en ausencia de toxina. b) Gráfica de Lippert que muestra los efectos de solvente sobre la emisión de fluorescencia del FITC obtenida como se explica en la Figura 9b.

inconsistencias en las actividades de formación de poro de las toxinas activadas con tripsina, nos cuestionamos si el problema de una baja inserción radicaba en el proceso de activación de la protoxina. En este sentido, nos propusimos analizar más detalladamente el proceso de activación de la toxina Cry1Ab.

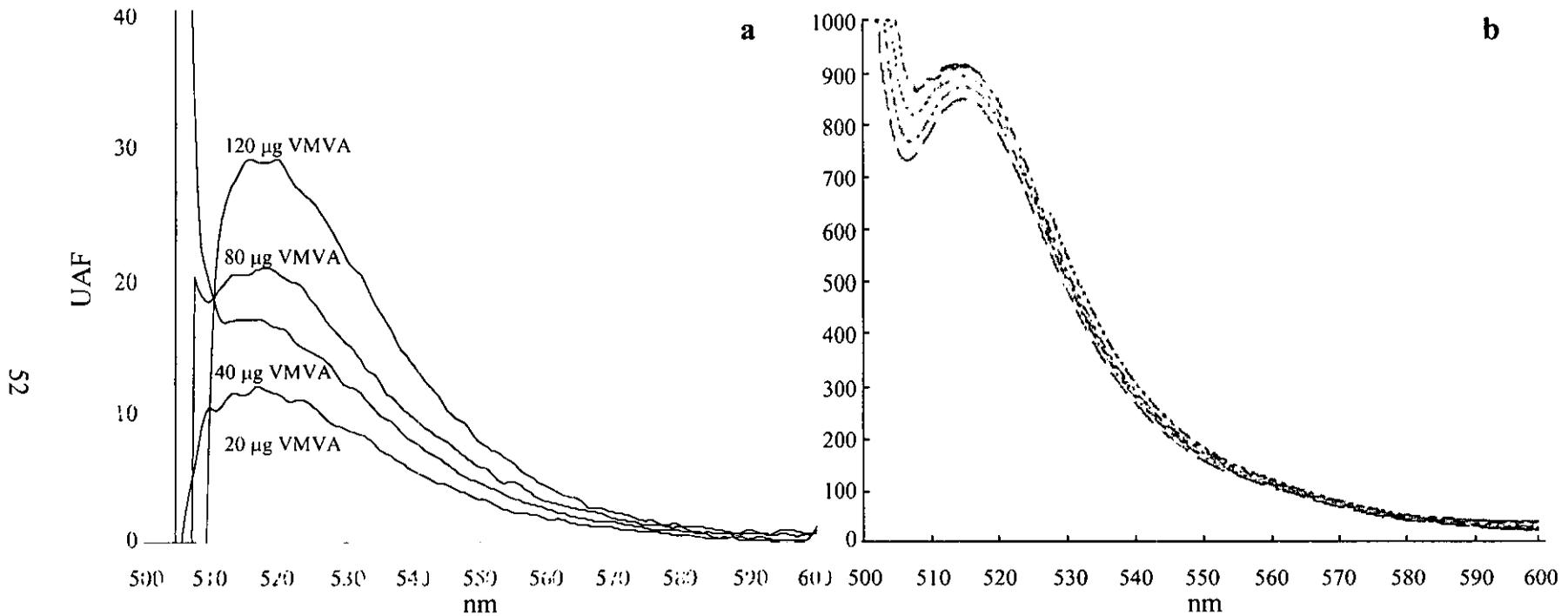


Figura 17. Interacción de la toxina Cry1Ab con VMVA. La toxina Cry1Ab (200 nM) marcada con FITC (estequiometría 2:1) fue incubada con 20, 40 80 y 120 µg de VMVA de *M. sexta*. Después de 1h de incubación a temperatura ambiente, las vesículas fueron empaquetadas por ultracentrifugación 100,000 x g y lavadas para remover la toxina no unida. La presencia de toxina en la pastilla y sobrenadante fue monitoreada espectrofluorométricamente. a) Espectros de emisión corregidos de la toxina unida a las vesículas. b) espectros de emisión de la toxina no unida que quedó en el sobrenadante.

5.2 Procesamiento *in vitro* e *in vivo* de la toxina Cry1Ab: Activación y degradación

Cuando se analizan de acuerdo a su peso molecular, las protoxinas Cry son agrupadas como proteínas de 130–135 kDa o como proteínas naturalmente truncadas de 70-73 kDa (Rukmini *et al.*, 2000). Independientemente de su tamaño, el proceso de activación por digestión proteolítica es un evento indispensable en el mecanismo de acción. En estudios de digestión de la protoxina de 130 kDa, con respecto al tiempo, se encontró que la toxina es generada por cortes proteolíticos secuenciales que remueven fragmentos de ~10 kDa desde el extremo C-terminal (Choma *et al.*, 1990). Adicionalmente, un péptido pequeño de 29-58 residuos del extremo N-terminal es removido de las protoxinas Cry de 70 y de 130 kDa (Choma *et al.*, 1990; Schnepf *et al.*, 1998), resultando en la producción de toxinas de 60-65 kDa.

El procesamiento intramolecular ha sido reportado para diversas toxinas Cry. Cry1Ab (Convents *et al.*, 1991), Cry1Ac (Lightwood *et al.*, 2000), Cry2Aa (Audtho *et al.*, 1999), Cry3A (Carroll *et al.*, 1997), Cry4Aa (Yamagiwa *et al.*, 1999), Cry4B, y Cry9Aa (Zalunin *et al.*, 1998) son cortadas dentro del dominio I, mientras que Cry11Aa (Dai and Gill, 1993), Cry1Ac (Choma *et al.*, 1990) y Cry1Aa (Pang *et al.*, 1999) son cortadas dentro del dominio II. El proceso de activación *in vivo* no está totalmente elucidado y podría variar debido a diferencias en la calidad y cantidad de las proteasas del intestino medio de los insectos. Con el objeto de entender mejor el papel de las proteasas del intestino medio en la activación de las protoxinas Cry, estudiamos la proteólisis *in vitro* e *in vivo* de Cry1Ab con el jugo gástrico de *Manduca sexta* y *Spodoptera frugiperda*. Este trabajo fue hecho con la suposición de que el jugo gástrico del insecto blanco contiene todas las proteasas necesarias y las condiciones ambientales para la eficiente activación de las protoxinas Cry.

5.2.1. Digestión de la protoxina Cry1Ab *in vitro* con jugo gástrico y tripsina

M. sexta es un lepidóptero altamente susceptible a la toxina Cry1Ab; en cambio, *S. frugiperda* resiste dosis mayores de 2000 ng/cm² (Aranda *et al.*, 1996). Aquí, se realizaron análisis de digestión de la protoxina Cry1Ab con tripsina o con jugo gástrico de *M. sexta* (relación proteasa/protoxina de 1/50 w/w). El producto de digestión con tripsina resultó ser una banda principal de 62 kDa que permaneció estable aun después de 13 h de incubación.

En contraste, después de 2 h de tratamiento con jugo gástrico de *M. sexta*, apareció un doblete principal de 60 y 58 kDa y una tercer banda de 30 kDa. Después de 13 h de incubación, la intensidad de las bandas de proteínas de mayor masa molecular decreció, mientras que aumentó el fragmento de 30 kDa (Fig. 18a). La producción de este fragmento fue analizada tras 2 h de digestión con diferentes relaciones de proteasa/protoxina usando jugo gástrico de larvas de *M. sexta* y de *S. frugiperda* en comparación con tripsina (Fig. 18b). Con una dilución 1/1000 de proteasas del intestino medio de *M. sexta* y *S. frugiperda*, el primer corte intramolecular produjo un doblete de 62 y 60 kDa. A medida que la proporción de jugo gástrico/protoxina se aumentó en forma logarítmica, se pudieron observar más diferencias en el patrón de bandeo en SDS-PAGE 10%. Con una dilución de 1/100, ocurrió un segundo corte que produjo una banda de 58 kDa, mientras que la de 62 kDa disminuyó. Finalmente, con diluciones de 1/10 y 1/2, se obtuvieron dos fragmentos de ~30 kDa. En contraste, altas concentraciones de tripsina (1/10 o 1/1) produjeron tanto la banda principal de 62 kDa como una banda de 33 kDa. En la Tabla 3 se muestran las secuencias N-terminales de los fragmentos obtenidos por los diferentes cortes. La Figura 18b muestra que la digestión proteolítica de la protoxina Cry1Ab es más eficiente en jugo gástrico de *S. frugiperda* que en el de *M. sexta*.

5.2.2. Digestión de Cry1Ab *in vivo*

Para determinar si los fragmentos de 30 kDa también son producidos *in vivo*, se alimentaron a la fuerza larvas de *M. sexta* de quinto instar con 10 µg de protoxina Cry1Ab. Después de la alimentación, el tejido del intestino medio fue disectado, y la presencia de protoxina y toxina fue ensayada mediante Western blot usando un anticuerpo policlonal anti-Cry1A. La producción *in vivo* de los fragmentos de 30 kDa fue observada después de 15 minutos y hasta 4 h, mientras que la cantidad de la proteína de 58 kDa disminuyó (Fig. 19).

5.2.3. Asociación de las proteínas de 30 kDa obtenidas por procesamiento intramolecular

La protoxina Cry1Ab digerida con jugo gástrico de *M. sexta* (1/10) fue cargada en una columna de exclusión molecular Superdex 200-10/30. Se colectaron fracciones de 1 ml

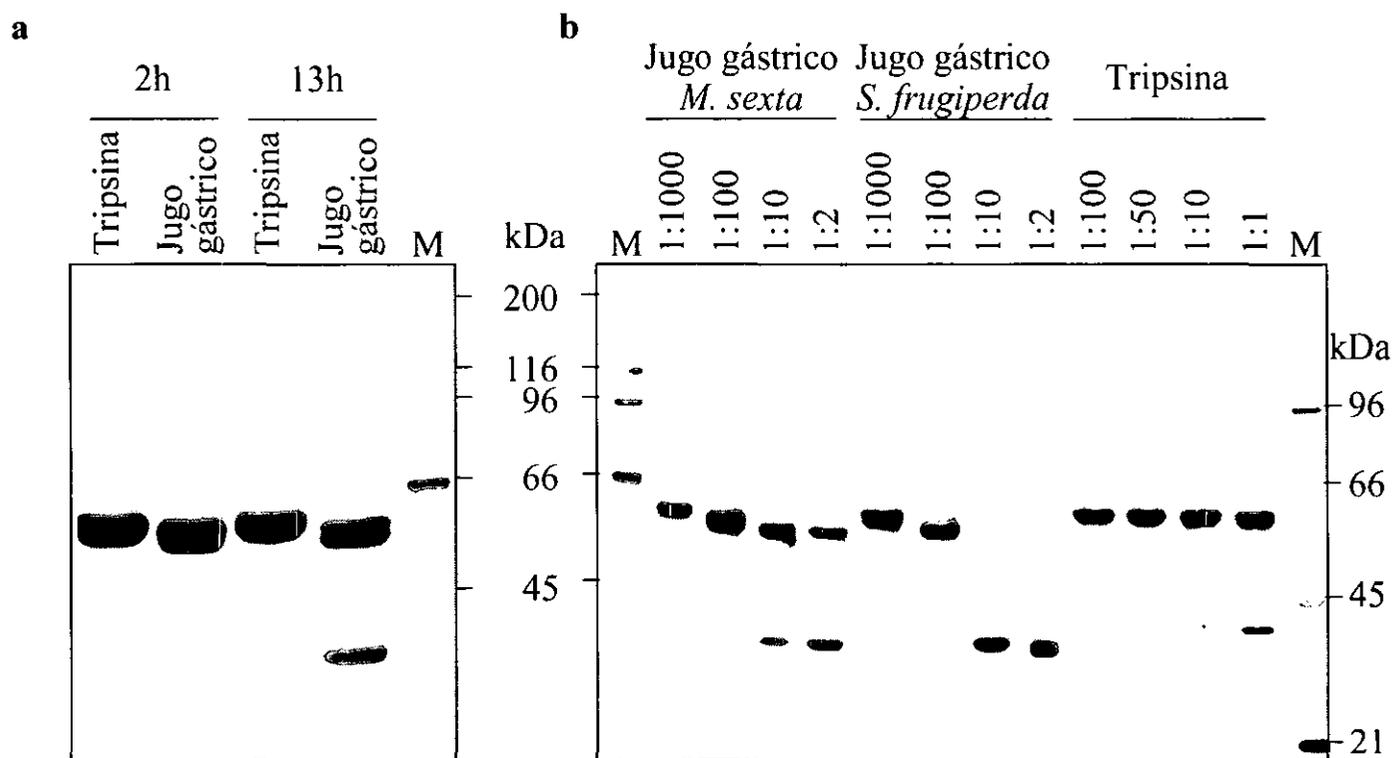


Figura 18. Procesamiento *in vitro* de la protoxina Cry1Ab. Análisis electroforético (SDS-PAGE 10%) de las proteínas obtenidas por digestión con tripsina o con las proteasas del jugo gástrico de *Manduca sexta* y *Spodoptera frugiperda*. a) Digestión por 2 y 13h de Cry1Ab con tripsina o jugo gástrico de *M. sexta* (proporción de proteasa:protoxina = 1:50 w/w). b) Digestión de Cry1Ab por dos horas a diferentes relaciones de proteasa:protoxina. La proteína fue teñida con azul brillante de Commassie. M, Marcadores de peso molecular.

Tabla 3. Secuencia N-terminal de los productos de digestión *in vitro*^a.

Corte	Posición ^b	Región	Proteasa	Producto (kDa)
	R ²⁸ I ²⁹ ETGY	Antes de α 1	<i>M. sexta</i> , <i>S. frugiperda</i> ^c , Tripsina	62
1 ^{er}	L ⁵⁷ G ⁵⁸ LVDI	Antes de α 2	<i>M. sexta</i> , <i>S. frugiperda</i>	60
2 ^o	F ⁶⁷ G ⁶⁸ PSQW	α 2a– α 2b	<i>M. sexta</i> , <i>S. frugiperda</i>	58
3 ^o	F ⁶⁷ G ⁶⁸ PSQW	α 2a– α 2b	<i>M. sexta</i> , <i>S. frugiperda</i>	30
3 ^o	nd	nd	<i>M. sexta</i> , <i>S. frugiperda</i> , Tripsina	30

^a Los productos de digestión, a diferentes relaciones proteasa:protoxina, fueron separados en SDS-PAGE 10% y posteriormente transferidos a PDVF. La proteína fue teñida con Ponceau S 0.2% y las bandas fueron recortadas y analizadas en el 6400/6600 Milligen/Biosearch Prosequencer.

^b Los numeros señalan los residuos entre los cuales se genera el corte proteolítico.

^c jugo gástrico de larvas de *Manduca sexta* o *Spodoptera frugiperda*
nd, no determinado.

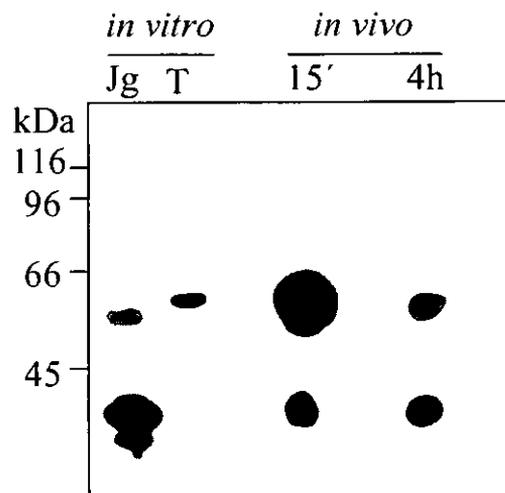


Figura 19. Procesamiento *in vivo* de Cry1Ab. Western blot de las proteínas obtenidas por la digestión *in vivo* de la protoxina Cry1Ab. Larvas de quinto instar de *M. sexta* fueron alimentadas con 10 µg de protoxina. Después de 15 minutos o 4 horas, el intestino medio fue disectado. Las muestras fueron sujetas a SDS-PAGE 10% y la toxina fue detectada por Western blot con un anticuerpo policlonal anti-Cry1A. Jg, Protoxina digerida *in vitro* con jugo gástrico de *M. sexta* (1:10 w/w) por 13 h. T, protoxina digerida *in vitro* con tripsina (1:50 w/w) por 13 h. La masa molecular (kDa) de los marcadores de referencia es indicada.

que fueron analizadas por Western blot con el anticuerpo policlonal anti-Cry1A. Como se muestra en la Figura 20a, los fragmentos de 30 kDa coeluyeron con el monómero de 58 kDa. Este resultado sugiere que estos polipéptidos se mantienen unidos por interacciones no covalentes y que el tratamiento con jugo gástrico no destruye la estructura de la proteína, sino que sólo corta algunos enlaces peptídicos.

Para identificar los dominios de la toxina presentes en las proteínas de 30 kDa, el producto de digestión de la protoxina Cry1Ab con jugo gástrico fue cargado en una columna de intercambio iónico HiTrap Q, previamente equilibrada con NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8.5. La proteína fue eluida con un gradiente lineal de NaCl 50–400 mM, en Tris-HCl 50 mM pH 8.5. Se colectaron fracciones que fueron analizadas por Western blot usando dos anticuerpos diferentes, el policlonal anti-Cry1A (Fig. 20b) y el anticuerpo monoclonal 4D6 que reconoce un epítipo dentro del dominio I (Fig. 20c). La Figura 20b muestra que la proteína de 30 kDa coeluye con la toxina de 58 kDa a aproximadamente 0.25 mM de NaCl, como pudo detectarse con el anticuerpo policlonal anti-Cry1A. Sin embargo, cuando las mismas fracciones fueron probadas con el anticuerpo monoclonal 4D6, la proteína de 30 kDa de sólo algunas fracciones cruzó con este anticuerpo (Fig. 20c). Estos resultados sugieren que dos diferentes fragmentos de 30 kDa son producidos por el tratamiento con las proteasas del jugo gástrico, un fragmento conteniendo el dominio I o parte de éste, y un segundo fragmento conteniendo el resto de la toxina.

5.2.4 Estudios funcionales de la toxina Cry1Ab

Para determinar si el procesamiento de la protoxina Cry1Ab, anteriormente descrito, está involucrado en la toxicidad contra *M. sexta* o, alternativamente, en la ruta de degradación dentro del intestino medio del insecto, se realizaron estudios funcionales de los diferentes pasos en el mecanismo de acción de las toxinas Cry en los que se comparó la toxina procesada con jugo gástrico contra la activada con tripsina.

La toxina Cry1Ab, obtenida por digestión a diferentes proporciones de jugo gástrico/protoxina, fue probada en ensayos de unión a VMVA de *M. sexta*. En la proporción de 1/100, cuando se obtuvo el fragmento de 58 kDa, se observó la unión de esta proteína a las vesículas (Fig. 21). A proporciones de 1/50 y 1/10, donde apareció la proteína de 30 kDa, tanto el polipéptido de 58 como el de 30 se unieron a las vesículas. Así,

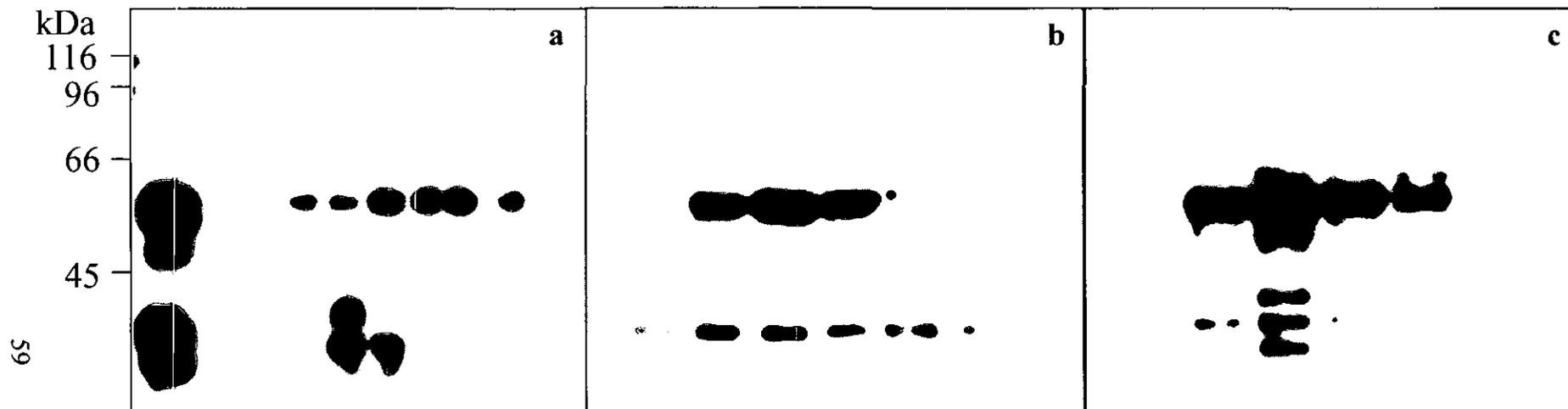


Figura 20. Transferencia tipo western de los perfiles de elusión de la protoxina Cry1Ab, digerida con jugo gástrico de *M. sexta*. a) Cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex H-200. Las fracciones cromatográficas fueron sujetas a SDS-PAGE 10% y la toxina fue detectada por Western blot con un anticuerpo policlonal anti-Cry1A. b) y c) Cromatografía de intercambio iónico en columna HiTrap Q con un gradiente lineal de 50 a 400 mM de NaCl en Tris-HCl 50 mM, pH 8.5. Las fracciones fueron sujetas a SDS-PAGE 10% y la toxina fue detectada por Western blot con el anticuerpo policlonal anti-Cry1A (panel b) o con el anticuerpo monoclonal 4D6 que reconoce un epítipo del dominio I de Cry1Ab (panel c). La masa molecular (kDa) de los marcadores de referencia es indicada.

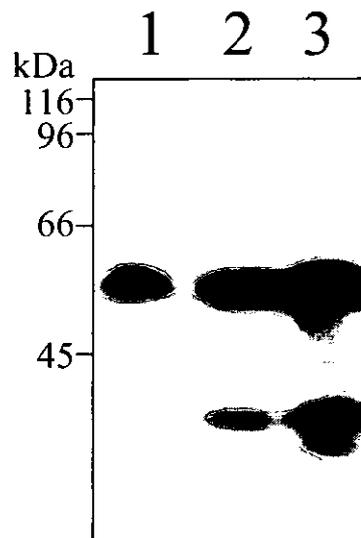


Figura 21. Unión de los fragmentos de digestión de Cry1Ab con jugo gástrico de *M. sexta* en vesículas de la microvellosidad apical de *M. sexta*. La protoxina fue procesada a diferentes relaciones proteasa:protoxina e incubada con 20 μ g de VMVA. Después de 1 h de incubación, la toxina no unida fue removida y las vesículas, conteniendo la toxina, fueron sometidas a SDS-PAGE 10%, transferidas a nitrocelulosa y detectadas con el anticuerpo policlonal anti-Cry1A. Carril 1, proteasa:protoxina 1:100; carril 2, 1:50; carril 3, 1:10. La masa molecular (kDa) de los marcadores de referencia es indicada.

el corte intramolecular que produce el fragmento de 30 kDa, no afecta la unión de los fragmentos a las VMVA.

Para analizar el efecto del tratamiento con proteasas del jugo gástrico en la actividad de formación de poro de la toxina CryIAb, se realizaron ensayos *in vitro* de la permeabilidad de K^+ como se reportó previamente (Lorence *et al.*, 1995). La Figura 22a muestra que el tratamiento moderado con jugo gástrico (2 h a una dilución de 1/1000), aumentó la actividad de CryIAb en los ensayos de permeabilidad a K^+ . La adición de la toxina activada, a concentración final de 50 nM, a las VMVA, cargadas con KCl 150 mM y suspendidas en MeGluCl 150 mM, produjo una rápida hiperpolarización. La respuesta del colorante a las adiciones de KCl también se incrementó, cuando se comparó con el control en el cual se adicionó una cantidad igual de amortiguador. Después de cada adición de KCl, se estableció un nuevo potencial de membrana y una depolarización fue producida. La Figura 22b muestra la pendiente de los cambios en fluorescencia vs. el potencial de equilibrio del K^+ . El mismo análisis fue realizado con la toxina activada por diferentes tratamientos (Tabla 4). La permeabilidad a K^+ obtenida con un tratamiento moderado con jugo gástrico (2 h a dilución de 1/1000) fue cinco veces mayor que la obtenida por el tratamiento de activación con tripsina durante 2 h a dilución de 1/100 (Tabla 4). Interesantemente, a medida que los fragmentos de 30 kDa fueron producidos, la actividad de formación de poro de la toxina fue disminuida. Así, tras una proteólisis extensiva (jugo gástrico/protoxina 1/1), la formación de poro fue 14 veces menor que la observada con la toxina obtenida con jugo gástrico/protoxina 1/1000 (Tabla 4).

La toxicidad de las protoxinas digeridas con jugo gástrico o con tripsina fue ensayada en larvas de primer instar de *M. sexta*. En la Tabla 5 se muestra que la protoxina no procesada tuvo la máxima actividad y que el tratamiento con proteasas, en las condiciones en que aparecen los fragmentos de 30 kDa, redujo la actividad insecticida.

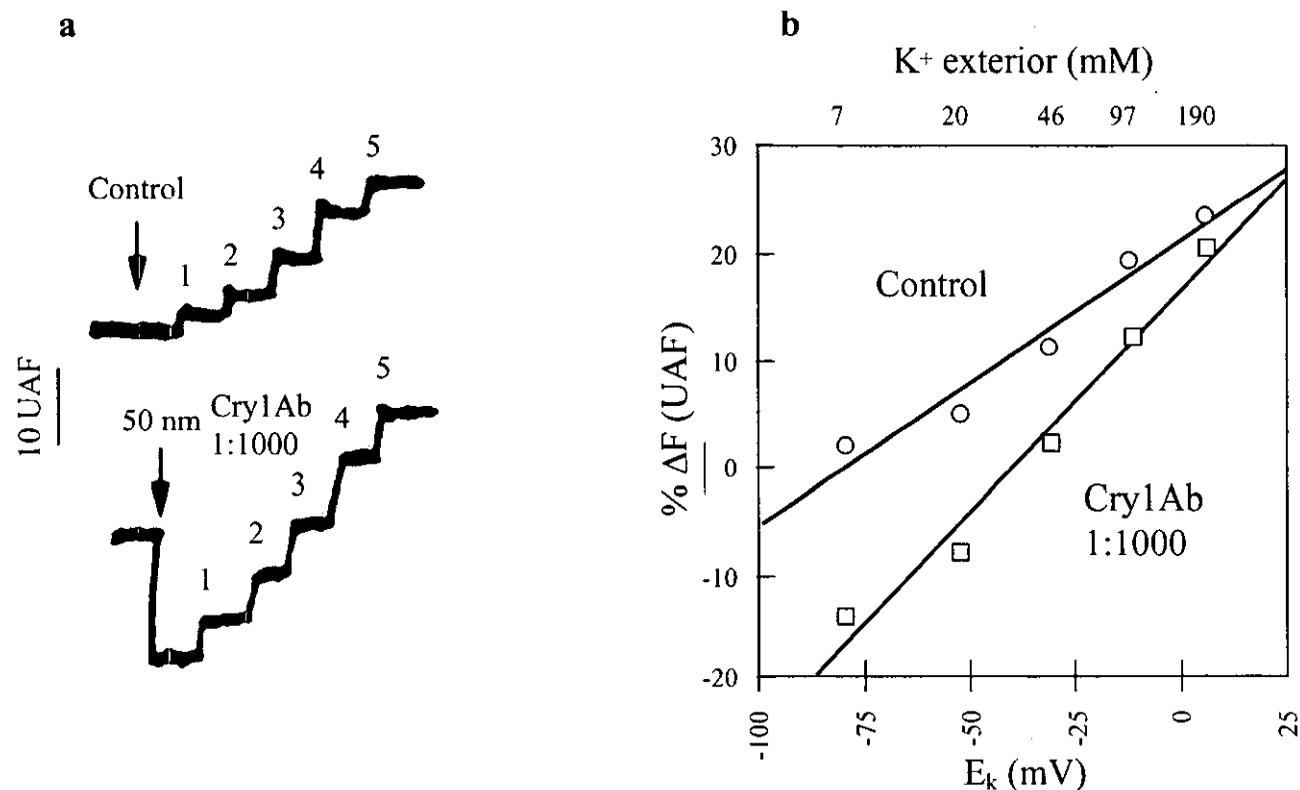


Figura 22. Permeabilidad a K⁺ a través de VMVA de *M. sexta* inducida por Cry1Ab. Ensayos realizados como se describe en la sección de material y métodos y en la Figura 8. a) Registro fluorescente de los cambios en permeabilidad a K⁺ producidos por la toxina Cry1Ab, digerida con jugo gástrico 1:1000. El amortiguador control contiene la misma cantidad de jugo gástrico, pero sin protoxina. UAF, unidades arbitrarias de fluorescencia. Las adiciones de KCl indicadas con números del 1 al 5, corresponden a las siguientes concentraciones finales de K⁺: 7, 22, 47, 98 y 195 mM. b) La pendiente (m), de la curva ΔF (%) vs. potencial de equilibrio de K⁺ (E_K⁺) (mV) o respecto a la concentración externa de K⁺, fue determinada. E_K⁺ fue calculado usando la ecuación de Nernst. Los cambios en fluorescencia fueron determinados 4 veces.

Tabla 4. Permeabilidad del K⁺ a través de las VMVA de *M. sexta* inducida por la toxina Cry1Ab.

Tratamiento	Corte	Proteasa/Protoxina ^a	$m_{tox}-m_{int}$ ^b
Jugo gástrico de <i>M. sexta</i>	1 ^{er}	1/1000	0.145
	2 ^o	1/100	0.059
	3 ^o	1/10	0.038
	3 ^o	1/1	0.010
Tripsina		1/100	0.028
		1/50	0.011
		1/20	0.006
		1/5	0.000

^a La protoxina Cry1Ab fue digerida por 13h con el tratamiento indicado. Después de la digestión se adicionó PMSF 1 mM y las muestras fueron analizadas en ensayos de permeabilidad de K⁺.

^b Las diferencias en la pendiente de la curva de cada toxina activada (m_{tox}) menos la pendiente del trazo control (m_{int}), en el cual la misma cantidad de amortiguador fue adicionado, son presentadas. La pendiente (m) de las curvas de los cambios en la fluorescencia (ΔF) (%) vs. el potencial de equilibrio del K⁺ (E_K^+) (mV), o vs. la concentración externa de K⁺, fue determinada en VMVA tratadas con Cry1Ab 50 mM (Fig. 22). Los valores son las pendientes medias de cuatro diferentes mediciones. Las desviaciones estándar fueron menores del 5%.

Tabla 5. Toxicidad de las proteínas Cry1Ab contra *M. sexta*.

Dosis (ng/cm ²)	Mortalidad (%) ^a				
	Protoxina	Jugo gástrico		Tripsina	
		2 h	13 h	2 h	13 h
10	83.3	29.2	20.8	16	4.2
20	87.5	87.5	41.7	60	37.5
50	100	100	87.5	95.8	70.8

^a Mortalidad registrada en 24 larvas de primer instar de *M. sexta* y corregida con la mortalidad no específica observada en las larvas control que no fueron alimentadas con la toxina. Las desviaciones estándar fueron menores del 5%.

5.2.5. Las VMVA tienen proteasas asociadas que activan correctamente a la protoxina Cry1Ab

La presencia de proteasas asociadas a las VMVA de *C. quinquefasciatus* fue reportada previamente (Dai and Gill, 1994). Sin embargo, en este estudio no se analizó la actividad de formación de poro de la toxina. Aquí encontramos que las vesículas de *M. sexta* tienen suficiente actividad de proteasa intrínseca para digerir a la protoxina hasta una proteína de menos de 60 kDa (Fig. 23a). La incubación de la protoxina (100 nM) con VMVA (10 µg), por 15 min, fue suficiente para obtener una toxina activa en formación de poro (Fig. 23b). Sin embargo, en tiempos mayores de incubación, se pudo observar una disminución en la actividad. Por otra parte, la incubación con VMVA inhibió significativamente el corte responsable de la producción de los fragmentos de 30 kDa cuando la toxina se procesa con jugo gástrico (Fig. 24). Estos resultados, en conjunto, podrían implicar que al interaccionar la toxina con las VMVA, posiblemente con el receptor, ésta sufre un cambio conformacional que permite la digestión proteolítica en un sitio que previamente no es fácilmente accesible a las proteasas. Alternativa o simultáneamente, el efecto podría ser explicado por la protección de la proteína contra las proteasas, de tal forma que se aumente la vida media de la forma activa.

5.2.6. La protoxina desnaturalizada no regresa a su estructura nativa

Se exploró la posibilidad de marcar la protoxina, para posteriormente procesarla proteolíticamente con VMVA y, así, obtener una toxina derivatizada fluorescentemente que tiene una alta eficiencia para insertarse en membranas y formar poro. Para ello, la protoxina fue incubada con FITC y después de remover la sonda libre, fue digerida con tripsina y los productos resultantes separados por SDS-PAGE 10%, electrotransferidos a una membrana de nitrocelulosa y detectados con un anticuerpo monoclonal anti-FITC conjugado a fosfatasa alcalina. Se encontró que la región tóxica de la proteína no fue marcada por la sonda (Fig. 25; banda de 60 kDa, comparar carriles 2 y 3). Este resultado sugiere que la región tóxica se encuentra en el centro hidrofóbico de la protoxina y, por lo tanto, inaccesible al solvente.

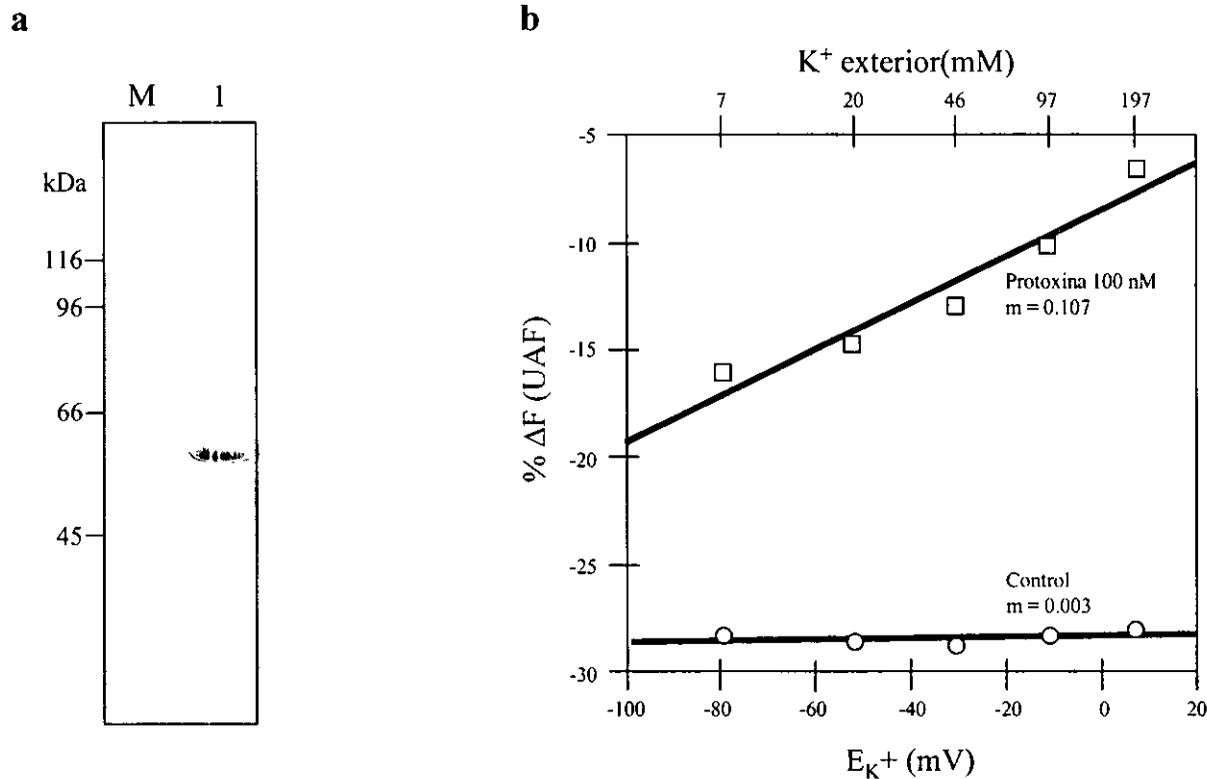


Figura 23. Activación de la protoxina Cry1Ab con VMVA. La protoxina Cry1Ab (100 nM) fue incubada con 10 μ g de vesículas de la microvellosidad intestinal de *M. sexta*, que fueron preparadas en ausencia de inhibidores de proteasas. Después de 15 minutos a 37°C, las vesículas fueron recuperadas por centrifugación y la proteína que se mantuvo en el sobrenadante fue analizada en: a) SDS-PAGE 10% y teñida con azul brillante de Comassie. Carriles: M, marcadores de masa molecular; 1, protoxina procesada con VMVA. b) ensayos de permeabilidad de K^+ realizados como en la figura 22.

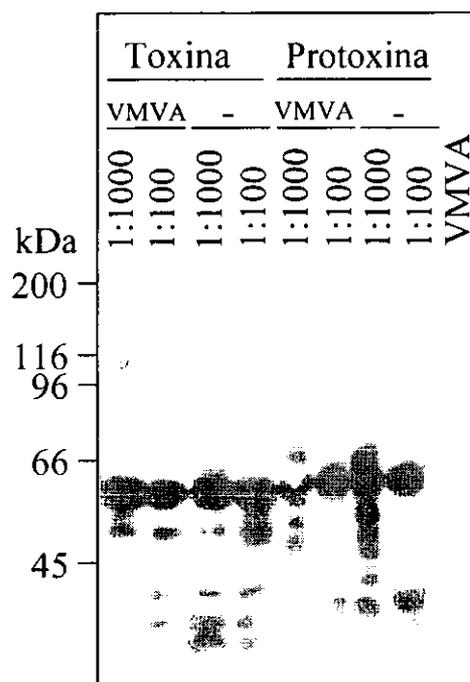


Figura 24. Las VMVA inhiben la degradación de la toxina y protoxina por jugo gástrico. La toxina o protoxina fueron preincubadas 15 minutos, con o sin 10 μ g de VMVA preparadas en presencia del cocktail de inhibidores de proteasas, CompleteTM. Posteriormente, se adicionó jugo gástrico de *M. sexta* a proporciones de 1:1000 y 1:100 (w/w). Después de 2 h de digestión, las muestras fueron cargadas en SDS-PAGE 10% y transferidas a nitrocelulosa para su posterior análisis por Western blot con el anticuerpo policlonal anti-Cry1A. La masa molecular (kDa) de los marcadores de referencia es indicada.

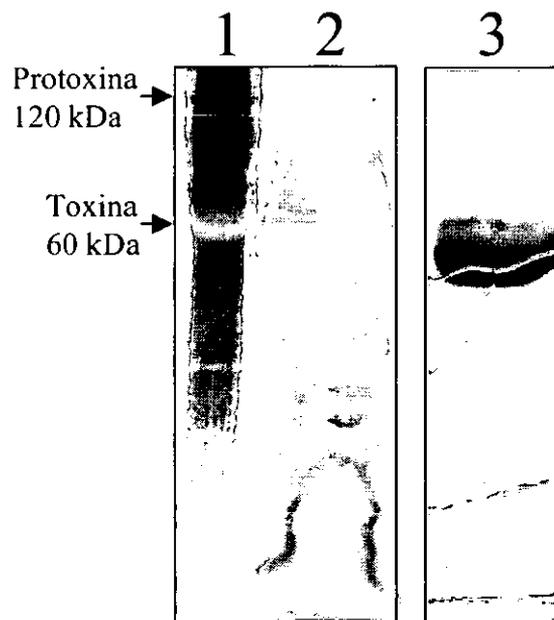


Figura 25. La región tóxica está protegida del solvente por la protoxina. La protoxina fue incubada con FITC (FITC:Proteína = 30:1 w/w) durante 16 h y después de remover la sonda libre por exclusión molecular, fue digerida con tripsina (1:50 w/w), sometida a SDS-PAGE 10% y teñida con azul brillante de Comassie (carril 3) y analizada por Western blot con un anticuerpo monoclonal anti-FITC (carriles 1 y 2). Carril 1, Protoxina no digerida; carriles 2 y 3, protoxina digerida con tripsina.

Con el fin de evaluar la posibilidad de desnaturalizar, marcar con FITC y posteriormente renaturalizar, la protoxina fue sujeta a hidrocloreuro de guanidina 3 y 6 M. Para saber si la desnaturalización y renaturalización tienen un efecto sobre la actividad insecticida, se realizaron bioensayos contra larvas de *M. sexta*. A diferencia de la protoxina nativa, la desnaturalizada-renaturalizada perdió completamente su toxicidad (Tabla 6). Esto excluyó la posibilidad de marcaje previo a la activación, pero planteó la pregunta del por qué la protoxina no podía ser renaturalizada hasta alcanzar su estructura nativa. En este sentido, se obtuvo el espectro de emisión de la fluorescencia intrínseca de la protoxina y se comparó con la de la protoxina desnaturalizada y con la de la desnaturalizada-renaturalizada. La protoxina tiene un máximo de emisión a 334 nm. La desnaturalización con hidrocloreuro de guanidina 3 M produjo un corrimiento espectral de 2 nm hacia el rojo. Al aumentar la concentración de hidrocloreuro de guanidina hasta 6 M, el corrimiento fue de 4 nm. La remoción del agente caotrópico por cromatografía de exclusión molecular, no regresó a la proteína a su estructura nativa. (Fig. 26).

Tabla 6. Toxicidad de la toxina Cry1Ab nativa y desnaturalizada-renaturalizada contra larvas de *M. sexta*^a.

Dosis (ng/cm ²)	Mortalidad (%)	
	Nativa	Renaturalizada ^b
2	20.8	4.2
10	91.7	25
50	100	8.3

^a La mortalidad fue valorada como se explica en la Tabla 5.

^b La toxina Cry1Ab fue sujeta a desnaturalización con hidrocloreuro de guanidina 6M. El agente caotrópico fue removido mediante cromatografía de exclusión molecular para permitir la renaturalización de la proteína.

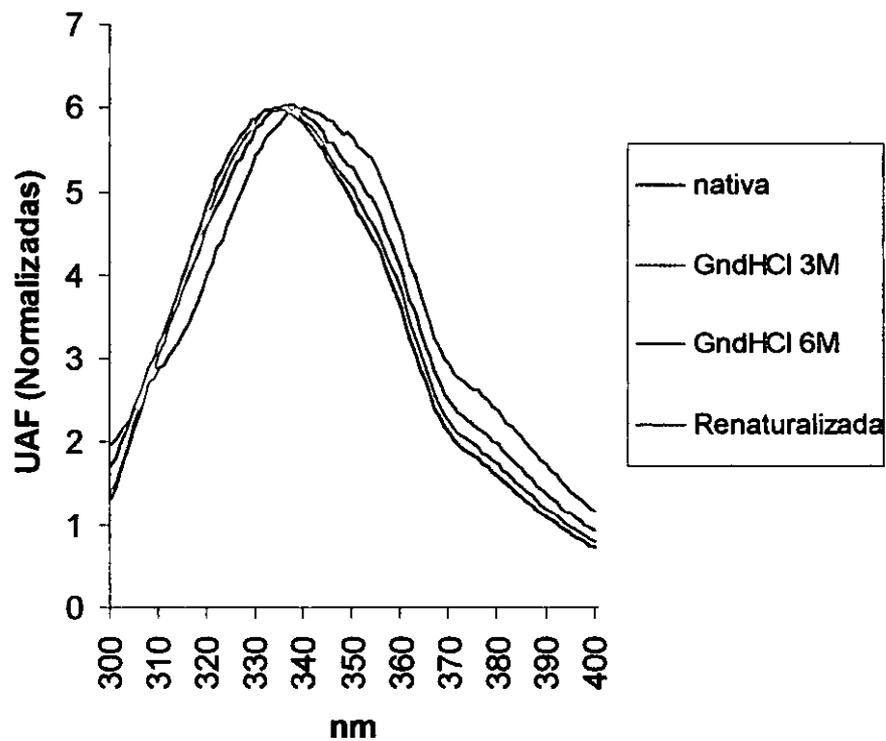


Figura 26. La protoxina desnaturalizada no regresa a su estructura nativa. Espectros de emisión de la fluorescencia intrínseca de la protoxina nativa, desnaturalizada con hidrocloreuro de guanidina 3 o 6 M y de la protoxina renaturalizada.

6. DISCUSIÓN

6.1 Análisis fluorescente de la toxina Cry1Ab.

Los eventos bioquímicos que hacen que las toxinas Cry se inserten en la membrana apical del intestino medio, es un tópico de gran interés en el área. Existe evidencia de que la toxina debe sufrir cambios conformacionales para pasar de un ambiente hidrofílico a otro anfipático. Sin embargo, hasta la fecha, la investigación se ha centrado en el dominio formador de poro y se desconoce si ocurren cambios en el resto de la proteína. Sería valioso contar con una estrategia experimental que permita estudiar la estructura de la toxina en la membrana, para proponer un modelo de los cambios conformacionales que acontecen como resultado de la inserción. De esta manera, sería posible estudiar la magnitud de tales cambios a través de la localización de residuos específicos respecto de su orientación en el ambiente de la membrana. Por este motivo, el objetivo inicial de este trabajo fue el análisis de los cambios conformacionales de la toxina Cry1Ab cuando se inserta en la membrana. Para ello, se planteó una estrategia experimental de espectroscopía de fluorescencia, que incluía el estudio estructural comparativo de la toxina en solución acuosa vs. la toxina insertada.

Una herramienta, utilizada con éxito para definir el ambiente en que se encuentran los residuos de triptofano de las proteínas integrales de membrana, es el apagamiento de la fluorescencia. Para ello se usan agentes que tras impactar con el fluoróforo excitado extraen su energía, la difunden como calor y, de esta forma, impiden la emisión de fluorescencia. De estos agentes, el ión yoduro y la acrilamida han sido extensamente usados (Lackowicks, 1983). El yoduro es incapaz de difundir a través de ambientes hidrofóbicos como las membranas, por lo cual sólo puede apagar la fluorescencia de los residuos expuestos al solvente acuoso. Por el contrario, la acrilamida difunde en ambientes hidrofóbicos y apaga la fluorescencia tanto de residuos expuestos al solvente como de aquellos que se encuentran protegidos.

El estudio del apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la toxina Cry1Ab permitió obtener un conocimiento más dinámico de la estructura de la toxina en solución. En presencia de yoduro, se observó que la exposición de triptofanos difiere en 10 % de la esperada según el modelo teórico (Fig. 11). Esta diferencia puede ser explicada debido a

que, a diferencia del modelo estructural generado por computadora, en base a la estructura cristalográfica de la toxina Cry1Aa, la emisión de la fluorescencia es sensible a la dinámica conformacional de la proteína. Este mismo análisis podría ser realizado con mutantes de triptofano, de tal manera que se podría determinar experimentalmente cuáles son los triptofanos más expuestos al solvente. Por otra parte, el análisis de estas mutantes podría aportar un conocimiento mucho más profundo de la estructura de la toxina Cry1Ab una vez insertada en membranas.

De igual forma, fue posible determinar mediante el análisis de marcaje fluorescente de las mutantes de lisina, que se construyeron durante el desarrollo del presente trabajo, que el residuo K403 se encuentra más accesible al solvente que el K490, y confirmar que K478 se encuentra dentro del centro hidrofóbico de la proteína (Fig. 15). Las toxinas Cry1 presentan un uso preferente de argininas como residuos con cargas positivas. Por ejemplo, Cry1Aa sólo presenta 2 residuos de lisina y 44 de arginina, mientras que Cry1Ab tiene tres lisinas en las posiciones 403, 478 y 490 y 43 residuos de arginina. Los residuos K478 y K490 se encuentran altamente conservados mientras que el residuo K403 es variable. La conservación de estos residuos, en particular de K478, sugirió que en esta posición, la toxina requiere una lisina como residuo con carga positiva. Sin embargo, ni la mutagénesis conservativa ni el marcaje afectaron la solubilización, procesamiento y actividad insecticida de estas toxinas (Fig. 14 y tabla 2). ¿Cuál es la razón de la alta conservación de los residuos K478 y K490? ¿Por qué del uso preferente de argininas como residuos de carga positiva? No es frecuente observar proteínas que tengan preferentemente argininas en lugar de lisinas. Se ha propuesto que como las toxinas Cry1 son tóxicas para lepidópteros, y que el pH del jugo gástrico de los lepidópteros es alcalino ($\text{pH} > 10.5$), el uso de argininas permitiría que en estas condiciones de pH, el 85% de las argininas expuestas al solvente se encuentren efectivamente con carga positiva, pero sólo el 57 % de las lisinas debido a que los pKas de los grupos guanidino y ϵ -amino son de 12.5 y 10.8, respectivamente. Es posible especular que la toxina requiere de estas cargas positivas para interaccionar eficientemente con la membrana, cuya superficie es negativa. A este respecto, resalta que las toxinas Cry activas contra coleópteros, en los cuales el pH del jugo gástrico es neutro o ácido, presentan una composición balanceada entre argininas y lisinas como residuos que aportan cargas positivas. Tal es el caso de la toxina Cry3A que tiene 35 residuos de lisina y 26 de arginina.

6.2 La inserción de las toxinas Cry en membranas.

Aquí, hemos explorado algunas variables experimentales para la inserción de la toxina Cry1Ab en membranas artificiales o biológicas (Figs. 12 y 17). Para los experimentos de inserción en membranas artificiales, se utilizaron vesículas pequeñas unilamelares preparadas con fosfatidilcolina y colesterol en tres diferentes relaciones molares. Se analizó si a diferentes valores de pH y diversas fuerzas iónicas, la toxina Cry1Ab puede insertarse espontáneamente, lo cual no se observó. Estos resultados, por supuesto, no implican que el pH o la fuerza iónica no sean condiciones relevantes para la interacción de la toxina con la membrana, sino que no se logró optimizar las condiciones que mimetizaran las condiciones *in vivo*. En otra serie experimental se exploró, también sin éxito, la posibilidad de forzar la incorporación de la proteína en las membranas mediante sonicación y/o en presencia de detergentes dializables durante el proceso de preparación de las vesículas.

Nuestros resultados contrastan con los resultados de formación de poro previamente reportados, en los que se demostró que las toxinas Cry son capaces de insertarse y abrir vías de permeabilidad en membranas modelo (English *et al.*, 1991; Haider and Ellar, 1989; Yunovitz and Yawetz, 1988). Mediante un análisis de la fluorescencia de la toxina Cry1Ab, fue posible estimar que se requiere de la inserción de 3×10^{12} moléculas para obtener una señal mínima dentro del límite de sensibilidad del espectrofluorómetro. Tanto la calidad de la membrana como la ausencia de receptor podrían ser factores determinantes para incorporar tal cantidad de proteína.

Para intentar insertar la toxina en membranas que contienen receptor, se incubó la toxina-FITC con VMVA de *M. sexta*. Encontramos inconsistencias en los resultados. Por una parte, tras la adición de las VMVA a la toxina se observó un corrimiento en la emisión del fluoróforo hacia longitudes de onda más cortas. En contraste, cuando las vesículas fueron preincubadas con la toxina y posteriormente separadas de la toxina no unida por ultracentrifugación, se encontró que sólo una fracción muy pequeña (1-3%) de la toxina se mantuvo asociada a las vesículas. En este último caso, a medida que se aumentó la cantidad de vesículas, se observó un comportamiento dosis-respuesta en la asociación de toxina.

A la fecha nadie ha planteado la pregunta de cuántas toxinas deben insertarse para lograr una actividad de formación de poro cuantificable. Se sabe que en presencia de receptor, es posible observar la unión de las toxinas marcadas con I^{135} a VMVA de insectos susceptibles a concentraciones de 2-10 nM. En contraste, para detectar la actividad de poro es necesario usar concentraciones de 1-50 nM de toxina. Esto, podría reflejar diferencias en la sensibilidad de las técnicas utilizadas, o que no todos los eventos de unión, a pesar de ser específicos, conducen a la inserción de las proteínas y su incorporación en el poro. Esto último podría estar relacionado con la reversibilidad del primer paso de la unión o con un fenómeno relacionado con la competencia de las toxinas para penetrar la membrana.

La inserción de la toxina depende de una correcta activación de la protoxina. Nuestra experiencia indica que el procesamiento de la toxina Cry1Ab con tripsina no produce de manera sistemática toxinas activas en formación de poro, sino que la actividad varía entre preparaciones diferentes e incluso es frecuente observar toxinas que son completamente inactivas. Además, no existe un consenso en la forma de activación y cada grupo procede con protocolos diferentes (Smedley *et al.*, 1997), por lo que el proceso de activación de Cry1Ab, y en general de las toxinas Cry1A, está siendo sujeto de investigación.

Encontrar una mejor condición de activación podría permitir insertar una mayor cantidad de moléculas de toxina y así hacer posible el estudio de la estructura de la toxina en membranas. En este sentido nos propusimos estudiar el procesamiento de la toxina Cry1Ab *in vitro* e *in vivo*.

6.3 Procesamiento de la toxina Cry1Ab.

La activación *in vitro* de las protoxinas Cry1A es comúnmente realizada con proteasas comerciales tales como tripsina, usualmente a bajas concentraciones, produciendo un fragmento tóxico de 60-70 kDa. Sin embargo, se ha reportado que, cuando se usan a altas concentraciones, otras proteasas, tales como subtilisina (Chestukhina *et al.*, 1990; Pang *et al.*, 1999), papaina (Choma *et al.*, 1990), quimotripsina, termolisina y pronasa (Convents *et al.*, 1991), producen polipéptidos más pequeños en las toxinas Cry1A. El procesamiento proteolítico dentro del dominio I ha sido reportado para diferentes toxinas Cry (Tabla 7). Sin embargo, el significado biológico de estos cortes no es claro debido a que se han reportado resultados contradictorios. Las toxinas Cry2Aa y Cry3A son cortadas entre las

Tabla 7. Cortes proteolíticos intramoleculares reportados para las toxinas Cry de *B. thuringiensis*.

Toxina	Posición ^a	Región	Proteasa ^b	Producto (kDa)	Actividad ^c	Referencia
Cry1Ab		$\beta 6-\beta 7$	Q, Tl, S, P	30		Convents et al, 1991
Cry1Aa		$\beta 6-\beta 7$	Q, Tl, S, P	30	-	Pang et al, 1999
Cry1Ac	L ⁴⁶ L ⁴⁷	$\alpha 2a-\alpha 2b$	<i>Sl</i>		+	Ogiwara et al, 1992
Cry1Ac	F ⁵⁰ V ⁵¹	$\alpha 1-\alpha 2$	<i>Mb</i>	58		Lightwood et al, 2000
Cry1Ac	F ⁶⁸ -G ⁶⁹	$\alpha 2a-\alpha 2b$	<i>Mb, Pb</i>	56		Lightwood et al, 2000
Cry2Aa		$\alpha 3-\alpha 4$	Q		-	Audtho et al, 1999
Cry3A	N ¹⁶¹ P ¹⁶²	$\alpha 3-\alpha 4$	Q	11 y 49	+	Carrol et al, 1997
Cry4A	R ²³⁵ Q ²³⁶	$\alpha 5-\alpha 6$	<i>Cp</i>	20 y 45	+	Yamagiwa et al, 1999
Cry4B			<i>Cp</i>	18 y 46		Komano et al, 1998
Cry4B		$\alpha 5-\alpha 6$	S		+	Zalunin et al, 1998
Cry9A		$\alpha 5-\alpha 6$	S		+	Zalunin et al, 1998
Cry9C		$\alpha 2\beta-\alpha 3$	T		-	Lambert et al, 1996
Cry11A	L ³⁶⁷ T ³⁶⁸	$\beta 5-\beta 6$			+	Dai and Gill, 1993

^a Los numeros señalan los residuos entre los cuales se genera el corte proteolítico.

^b Q, quimotripsina; Tl, termolisina; S, subtilisina; P, pronasa; T, Tripsina; *Sl*, *Spodoptera lituaria*; *Mb*, *Mamestra brassicae*; *Pb*, *Pieris brassicae*; *Cp*, *Culex pipiens*.

^c Actividad insecticida.

hélices $\alpha 3$ - $\alpha 4$ por quimotripsina. La toxina procesada Cry2Aa no retiene la actividad insecticida (Audtho *et al.*, 1999). En contraste, la toxina Cry3A incrementó su solubilidad sobre un rango de pH más amplio, y retuvo su actividad completa contra larvas del coleóptero susceptible (Carroll *et al.*, 1997). Cry4A, Cry9A y Cry4B fueron cortadas entre las hélices $\alpha 5$ - $\alpha 6$ por las proteasas del intestino medio de *Culex pipiens* para Cry4A y subtilisina para Cry9A y Cry4B. Las proteínas procesadas fueron tóxicas para la larva susceptible y los polipéptidos permanecieron asociados en un complejo (Yamagiwa *et al.*, 1999; Zalunin *et al.*, 1998). Komano y cols. (1998) reportaron que el procesamiento *in vitro* de Cry4B por proteasas del intestino medio de *C. pipiens* produjo fragmentos inactivos de 18 y 46 kDa. Cry9C fue digerida por tripsina después de la hélice $\alpha 2b$. Este procesamiento tuvo como resultado una proteína completamente inactiva (Lambert *et al.*, 1996). En contraste, el corte proteolítico de Cry1Ac por proteasas del intestino medio de *Spodoptera litura* antes de la hélice $\alpha 2b$ tuvo poco efecto en la toxicidad contra larvas de *Plutella xylostella* (Ogiwara *et al.*, 1992).

En este trabajo, se demostró que el procesamiento *in vitro* e *in vivo* de la protoxina Cry1Ab por proteasas del intestino medio de *M. sexta* involucró tres cortes intramoleculares. Los productos del tratamiento con estas proteasas fueron diferentes de los obtenidos con tripsina. El tratamiento extensivo con tripsina en una proporción tripsina/protoxina de 1/1 produjo tanto la proteína de 62 kDa como la de 33 kDa (Fig. 18b). En contraste, la activación *in vitro* con jugo gástrico produjo fragmentos de 60 kDa, 58 kDa y dos de ~ 30 kDa (Fig. 18b). El primer corte realizado por las proteasas del intestino medio ocurrió a una proporción de proteasa/protoxina igual a 1/1000 y resultó en un fragmento de 60 kDa. La secuencia N-terminal de este fragmento, indicó que su formación fue el resultado del corte entre los residuos Leu-57 y Gly-58 en la secuencia L⁵⁷G⁵⁸LVDI localizada al inicio de la hélice $\alpha 2a$ (Tabla 3). El segundo evento proteolítico fue realizado a una proporción de proteasa/protoxina de 1/100, produciendo un fragmento de 58 kDa. La secuencia N-terminal de este fragmento, localiza el sitio de corte entre los residuos Phe-67 y Gly-68 en la secuencia F⁶⁷G⁶⁸PSQW entre las hélices $\alpha 2a$ - $\alpha 2b$ (Tabla 3). La máxima actividad de formación de poro *in vitro* fue observada después del primer corte intramolecular, tras lo cual la actividad decayó a medida que ocurrieron los cortes subsiguientes (Fig. 22 y Tabla 3). En comparación, la secuencia N-terminal del producto de

digestión con tripsina indicó que el corte ocurre entre los residuos R-28 e I-29 de la secuencia R²⁸I²⁹ ETGY (Tabla 3), como previamente había sido reportado (Grochulski *et al.*, 1995).

Finalmente, un tercer corte intramolecular produjo dos fragmentos de ~30 kDa, probablemente dentro del dominio II. Uno de los fragmentos tiene el extremo N-terminal del segundo evento proteolítico con la secuencia G⁶⁸PSQW (Tabla 3). No fue posible obtener la secuencia N-terminal del otro fragmento de ~30 kDa, debido a que la secuencia se encontró bloqueada.

La actividad de formación de poro fue severamente reducida cuando estos dos fragmentos fueron producidos (Tabla 4). La toxicidad *in vivo* también fue disminuida (Tabla 7). Dado el tamaño de la toxina y de los fragmentos, proponemos que este último corte podría ser realizado en el dominio II. Se ha reportado que la proteólisis *in vitro* por diferentes proteasas (quimotripsina, termolisina, subtilisina y pronasa) cortaron las protoxinas Cry1Ab (Convents *et al.*, 1991) y Cry1Aa (Pang *et al.*, 1999) en el asa que conecta las hojas β 6- β 7 del dominio II, produciendo dos fragmentos con una masa de 30 kDa (Tabla 7). En el caso de la toxina Cry1Aa, este procesamiento inactivó a la proteína contra *Bombyx mori* (Pang *et al.*, 1999). Estos datos sugieren que el corte dentro del dominio II de las toxinas Cry1A podría estar involucrado en la inactivación. El hecho de que los fragmentos de 30 kDa fueran encontrados *in vivo* después de 15 minutos de digestión y de que se encontraran presentes aún después de 4 h de la ingesta (Fig. 19), sugiere que estos fragmentos son intermediarios estables en la ruta de degradación de la toxina Cry1Ab catalizada por las proteasas del intestino medio de *M. sexta*.

Secuencias N-terminales similares a las de los dos primeros cortes aquí reportados han sido descritas para la toxina Cry1Ac. Estas son producidas por el jugo gástrico de tres diferentes insectos lepidópteros (Tabla 7). El primer corte fue encontrado sólo con el tratamiento de la protoxina Cry1Ac con jugo gástrico de *Mamestra brassicae* (Lightwood *et al.*, 2000). El segundo corte fue encontrado mediante el tratamiento con jugo gástrico de tres insectos (*M. brassicae*, *Pieris brassicae* y *Spodoptera litura*) (Lightwood *et al.*, 2000; Ogiwara *et al.*, 1992). La activación de Cry1Ac con proteasas del intestino medio de *S. litura* resultó en una ligera reducción en la toxicidad contra larvas de *P. xylostella*. La activación con jugo gástrico de *M. brassicae*, la cual es una larva de lepidóptero no

susceptible a Cry1Ac, generó productos de 58, 40 y 20 kDa que son insolubles (Lightwood *et al.*, 2000).

En este trabajo encontramos que el tratamiento con jugo gástrico produjo una toxina más activa en ensayos de formación de poro que el tratamiento con tripsina (Tabla 4). La mayor actividad de formación de poro fue obtenida cuando la hélice $\alpha 1$ fue cortada. Resulta evidente en la Figura 18b que a diferencia del jugo gástrico de *M. sexta*, el tratamiento con tripsina no produce los dos primeros cortes en el extremo N-terminal de Cry1Ab. Estos datos sugieren que los cortes ocurridos al inicio de la hélice $\alpha 2a$ y entre las hélices $\alpha 2a$ - $\alpha 2b$, podrían ser producidos por proteasas diferentes a la tripsina que se encuentran en el jugo gástrico. Alternativamente, las tripsinas de insecto podrían tener diferentes propiedades y/o especificidades que sus contrapartes en mamíferos. También concluimos que la hélice $\alpha 1$ podría ser dispensable para la inserción en la membrana y/o formación de poro. Estos datos concuerdan con el reporte previo de Aronson y Cols. (1999), el cual muestra que el tratamiento con proteinasa K de Cry1Ac unida a VMVA de *M. sexta*, removió la hélice $\alpha 1$ y el inicio de la hélice $\alpha 2$, mientras que el resto de la toxina permaneció resistente a posterior proteólisis. Adicionalmente, Ogiwara y Cols. (1992) reportó que las proteasas del intestino medio de *P. xylostella* digirieron a Cry1Ac entre los residuos Leu-46 y Leu-47, localizados después de la hélice $\alpha 1$, sin decremento en la toxicidad contra larvas de *P. xylostella*. Por último, el péptido sintético correspondiente a la hélice $\alpha 1$ fue el único, de las 7 hélices α del dominio I, que no se unió a la membrana lipídica (Gazit *et al.*, 1998).

Los dos fragmentos de 30 kDa, obtenidos por tratamiento con jugo gástrico, permanecieron asociados en solución (Fig. 20), posiblemente mediante interacciones no covalentes, por lo que se sugiere que este corte no involucra la pérdida de la estructura globular de la proteína. Resultados similares fueron obtenidos mediante la digestión de las protoxinas Cry3A y Cry4A con quimotripsina, en las que los fragmentos permanecieron asociados en condiciones no desnaturizantes (Carroll *et al.*, 1997; Yamagiwa *et al.*, 1999). También, en concordancia con el reporte de que Cry3A digerida con quimotripsina se unió a VMVA de *L. decemlineata* (Carroll *et al.*, 1997; Martinez-Ramirez and Real, 1996), encontramos que los fragmentos de 58 y de 30 kDa, obtenidos tras la digestión de la protoxina Cry1Ab con jugo gástrico, se unieron a las VMVA de *M. sexta* (Fig. 21).

El procesamiento proteolítico de las toxinas Cry es un paso crítico que no sólo está involucrado en la activación de la protoxina, sino que también podría estar implicado en la especificidad de la toxina (Haider and Ellar, 1989; Haider *et al.*, 1989) y en la resistencia de los insectos (Oppert *et al.*, 1997; Shao *et al.*, 1998). La carencia de una proteasa principal en *Plodia interpunctella* es responsable de su resistencia a las toxinas Cry de *Bt* subsp. *entomocidus* HD198 (Oppert *et al.*, 1997). Por otra parte, se ha reportado que la rápida degradación de las toxinas Cry está asociada con la pérdida de susceptibilidad de larvas de quinto instar de *S. litoralis* hacia Cry1C (Keller *et al.*, 1996) y que los inhibidores de serin-proteasas aumentaron la actividad insecticida de algunas toxinas de *Bt* hasta en 20 veces (MacIntosh *et al.*, 1990).

Aquí, encontramos que el jugo gástrico de *S. frugiperda*, un lepidóptero tolerante a Cry1Ab, tuvo una mayor capacidad para producir los fragmentos de 30 kDa que el jugo gástrico de *M. sexta* (Fig. 18b). Las proteasas del intestino medio de este insecto degradaron a la toxina Cry1Ab al menos cinco veces más rápido que las de *M. sexta*. Debido a que *S. frugiperda* es altamente resistente a Cry1Ab (Aranda *et al.*, 1996), nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la inactivación de las toxinas Cry, mediante digestión por las proteasas del intestino medio, podría ser considerado como un mecanismo de resistencia. Por lo tanto, la generación de mutantes de Cry1Ab resistentes a los cortes específicos por las proteasas del intestino medio, podría aumentar la potencia de este insecticida biológico. En este sentido, al eliminar el sitio de corte en el dominio II de Cry1Ac no se encontró ningún efecto en su toxicidad contra *P. brassicae* (Lightwood *et al.*, 2000). Sin embargo, como se mostró en este trabajo, la inactivación de la toxina comienza desde que ocurre el corte que separa la hélice $\alpha 2a$ del resto de la proteína. Sería interesante eliminar ambos sitios de corte y probar si existe un aumento en su toxicidad.

Finalmente, en este trabajo se encontró que las VMVA contienen actividad de proteasa asociada a la membrana que fue suficiente para digerir y activar a la protoxina Cry1Ab (Fig. 23). Además, la interacción de las vesículas con la toxina tiene un efecto protector contra la inmediata degradación de la toxina por las proteasas del intestino medio. En un trabajo simultáneo, en nuestro laboratorio, desarrollado por Isabel Gómez y Mario Soberón, se observó este mismo efecto mediante la preincubación de la protoxina con un fragmento de anticuerpo, scFV73, y su posterior digestión con tripsina o jugo gástrico. Este

fragmento de anticuerpo fue seleccionado por competir con la unión de la toxina Cry1Ab a las VMVA y se encontró que es homólogo una secuencia de la cadherina E. En contraste, la preincubación de protoxina con otro fragmento de anticuerpo, scFV45, que no compite por la unión de la toxina a las VMVA, no tuvo el mismo efecto. Es posible que la cadherina E, que se ha identificado como receptor de Cry1Ab, participe en el mecanismo de acción de esta toxina, probablemente mediante la inducción de un cambio conformacional de la protoxina que permita la correcta activación, y/o mediante la protección de ésta contra la ulterior degradación por proteasas digestivas.

Cuando se separaron las vesículas por centrifugación, se observó que una fracción de la toxina estaba asociada a las membranas. Esto podría proporcionar un medio para la inserción de toxina en membranas que pudiera ser estudiado mediante espectroscopía de fluorescencia. Para ello se planteó la posibilidad de marcar fluorescentemente a la toxina en su forma de protoxina. Sin embargo, el marcaje de esta proteína con FITC resultó en el marcaje exhaustivo de la región C-terminal, mientras que se excluyó selectivamente el marcaje de la región tóxica. Se exploró la posibilidad de marcar la protoxina que previamente fue desnaturalizada con hidrocloreuro de guanidina, pero desafortunadamente no fue posible renaturalizar a la protoxina hasta su forma nativa, lo cual fue observado mediante el registro y comparación de los espectros de emisión de la protoxina nativa, desnaturalizada y renaturalizada. Adicionalmente, se observó que la desnaturalización y renaturalización de la protoxina terminó con la actividad insecticida.

6.4 Comentario final

Una vez ingeridos, los cristales son solubilizados y la protoxina liberada es sometida a un ambiente altamente proteolítico, como lo es el lumen del intestino medio. Esto provoca la digestión inmediata que en primer instancia está relacionada con la activación, pero que casi simultáneamente es seguida por la degradación de la toxina. Previamente se consideraba que la proteína de 60 kDa era resistente a posterior digestión proteolítica y que esta forma se constituía como la entidad tóxica. Los datos aquí presentados sugieren que la digestión intramolecular que remueve la hélice $\alpha 1$ de la toxina Cry1Ab es necesaria para una completa activación y que a este corte le siguen casi inmediatamente otros que la inactivan.

En el tránsito del lumen a la membrana intestinal, la proteína debe superar la barrera impuesta por la membrana peritrófica (Bravo *et al.*, 1992). Se sabe que esta membrana es capaz de unir a la toxina, lo cual significa un mecanismo de defensa físico que inevitablemente disminuirá la cantidad de proteína disponible para lograr el efecto fisiológico característico por la intoxicación con toxinas Cry.

Con lo anteriormente dicho es posible proponer que la estrategia de *Bacillus thuringiensis* como patógeno, consiste en asegurar que el número suficiente de toxinas llegue a la vecindad de la microvellosidad apical del intestino medio, y que además, al menos una fracción de éstas se inserte en la membrana para formar los poros que eventualmente lleven a la lisis celular y a la muerte del insecto. En este sentido, es evidente la ventaja que presenta la producción de grandes inclusiones cristalinas como paquetes que contienen las δ -endotoxinas. Por otra parte, es posible entender el porque del uso de una gran cantidad de materia y energía, para la síntesis de estas proteínas durante el proceso de esporulación.

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1. El procesamiento de la protoxina Cry1Ab con tripsina no es suficiente para una correcta activación de la proteína (Fig. 18, Tablas 4 y 5). Sin embargo, dado que no se pierde la actividad insecticida, se propone que el fragmento resistente a tripsina debe ser posteriormente procesado por las proteasas del intestino medio del insecto.
2. Se encontró que la condición experimental en que se remueve la hélice $\alpha 1$ es la que genera una toxina con mayor actividad de formación de poro, por lo que se concluye que esta hélice es dispensable (Tablas 3 y 4). Para determinar si la ocurrencia de este corte es indispensable para la actividad insecticida de la toxina Cry1Ab, sería necesario remover el sitio de corte por mutagénesis dirigida.
3. La actividad de formación de poro disminuye cuando ocurre el corte que remueve la hélice $\alpha 2a$ (Tablas 3 y 4). Sin embargo, en condiciones de proteólisis exhaustiva, cuando aparecen los fragmentos de 30 kDa (Fig. 18; jugo gástrico de *M. sexta* 1:10), la toxina pierde totalmente la actividad de formación de poro (Tablas 3 y 4; tercer corte). Por otra parte, la velocidad de generación de estos cortes es mayor con el jugo gástrico del insecto resistente *S. frugiperda* que con el del insecto sensible *M. sexta* (Fig. 18). Concluimos que estos cortes están implicados en la ruta de degradación de la toxina Cry1Ab por las proteasas del intestino medio y que los fragmentos de 30 kDa son intermediarios estables de esta ruta de degradación. Sería muy útil generar mutantes que no tengan estos sitios para obtener una toxina más resistente a la degradación y, por lo tanto, potencialmente más tóxica.
4. Los cortes ocurridos dentro de la hélice $\alpha 2a$ y entre las hélices $\alpha 2a$ - $\alpha 2b$ (Tabla 3) podrían ser producidos por proteasas diferentes a la tripsina que se encuentran en el jugo gástrico. Alternativamente, las tripsinas de insecto podrían tener diferentes propiedades y/o especificidades respecto a sus contrapartes de mamíferos.

5. Los fragmentos de 30 kDa se mantienen unidos entre sí por interacciones no covalentes (Fig. 20a). Además, estos fragmentos son capaces de unirse a las vesículas de la microvellosidad apical de *M. sexta*. Sería interesante determinar si estos fragmentos no tóxicos, son capaces de competir con la toxina por el receptor.
6. Las vesículas de la microvellosidad apical disminuyen la velocidad de degradación tanto de la toxina como de la protoxina por las proteasas del jugo gástrico de *M. sexta* (Fig. 24). Además, estas vesículas tienen proteasas asociadas que son capaces de procesar a la protoxina Cry1Ab hasta su forma activa. Estos datos sugieren que la interacción de la toxina con la membrana del intestino medio, presumiblemente con el receptor, protege a la toxina contra la generación de los cortes proteolíticos implicados en la degradación. Alternativa o adicionalmente, esta interacción podría inducir cambios conformacionales en la toxina, los cuales podrían ser relevantes para la correcta activación e inserción. Esto podría ser estudiado con el fragmento de anticuerpo scFV73 que además de unirse específicamente a la toxina, tiene el mismo efecto que las VMVA en la activación y protección contra la degradación de la protoxina Cry1Ab.
7. La región tóxica en la protoxina es inaccesible al solvente, por lo tanto no fue posible marcarla con FITC para posteriormente incubar la protoxina con las VMVA de *M. sexta* (Fig. 25). Por otra parte, la desnaturalización con hidrocloreuro de guanidina y la posterior remoción del agente caotrópico termina totalmente con la actividad insecticida de la protoxina (Tabla 6). La proteína no regresa a su forma nativa (Fig. 26).
8. La limitante para el estudio de la estructura de la toxina insertada en membrana fue la cantidad de proteína que se incorporó a las vesículas, artificiales o naturales (Figs. 12 y 17). Una mejor activación proteolítica seguramente repercutirá en una mejor inserción, por lo que los resultados aquí presentados son potencialmente útiles para estandarizar las condiciones que permitan estudiar la estructura de la toxina insertada en membranas aisladas del intestino medio. Por otra parte, se podría explorar la posibilidad de

incorporar la toxina a vesículas artificiales, preparadas con mezclas de lípidos que formen membranas resistentes a detergentes.

9. El análisis de la estructura de la toxina en solución acuosa mediante herramientas de espectroscopía de fluorescencia (Figs. 9, 10, 11, 13 y 15), permitió validar el modelo de Cry1Ab generado a partir de las coordenadas cristalográficas de Cry1Aa. Una vez encontrada la condición de inserción, el análisis de la emisión y del apagamiento de la fluorescencia con yoduro o acrilamida podría ser útil para estudiar el ambiente en que se encuentran diferentes residuos de la proteína.

10. La mutagénesis conservativa sitio-dirigida mostró que ninguna de las tres lisinas presentes en la toxina Cry1Ab es indispensable para la actividad insecticida (Fig. 14). Se encontró que el residuo K403 es el más accesible al marcaje fluorescente y que el residuo K490 se marca más lentamente mientras que el K478 no se marca (Fig. 15). El marcaje en estas posiciones no afecta la actividad insecticida (Tabla 2). La mutante doble K403R-K490R podría ser utilizada para experimentos de mutagénesis en los que se introduzcan residuos de lisina y de esta forma poder marcar y estudiar otras regiones de la proteína. Con la introducción adicional de un residuo de cisteína se podrían realizar estudios de transferencia de energía de fluorescencia para medir los cambios conformacionales de la toxina insertada en la membrana.

8. REFERENCIAS

- Agrawal A. A. (2000) Mechanisms, ecological consequences and agricultural implications of tri-trophic interactions. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **3**, 329-335.
- Alcantara E. P., Alzate O., Lee M. K., Curtiss A., Dean D. H. (2001) Role of alpha-helix seven of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin in membrane insertion, structural stability, and ion channel activity. *Biochemistry*. **40**, 2540-2547.
- Ali A., and Young S. Y. (1996). Activity of *Bacillus thuringiensis* Berliner against different ages and stages of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton. *J. Econ. Entomol.* **31**:1-8.
- Aranda E., Sánchez J., Peferoen M., Güereca L. and Bravo A. (1996) Interaction of *Bacillus thuringiensis* crystal protein with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* **68**, 203-212.
- Arantes O. and Lereclus D. (1991) Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* **108**, 115-119.
- Aronson A. I., Beckman W. and Dunn P. (1986) *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* **50**, 1-24.
- Aronson A. I., Geng C. and Wu L. (1999) Aggregation of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins upon binding to target insect larval midgut vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2503-2507.
- Audtho M., Valaitis A. P., Alzate O. and Dean D. H. (1999) Production of chymotrypsin-resistant *Bacillus thuringiensis* Cry2Aa1 δ -endotoxin by protein engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4601-4605.
- Bechtel D. B. and Bulla L. A. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **127**, 1472-1481.
- Beegle C. C. and Yamamoto T. (1992) History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *Can. Entomol.* **124**, 587-616.
- Bell R. A. and Joachim F. G. (1976) Techniques for rearing laboratory colonies of tobacco budworms and pink bollworms. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **69**, 365-373.
- Bosch D., Schipper B., van der Kleij H., de Maagd R. A. and Stiekema W. J. (1994) Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. *Biotechnology (N Y)* **12**, 915-918.
- Bradley D., Harkey M. A., Kim M. K., Biever K. D., Bauer L. S. (1995) The insecticidal CryIB crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **65**, 162-173.
- Bravo A. (1997) Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains. *J. Bacteriol.* **179**(9):2793-801.
- Bravo A., Jansens S. and Peferoen M. (1992) Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *J. Invertebr. Pathol.* **60**, 237-247.
- Bravo A., Sarabia S., López L., Ontiveros H., Abarca C., Ortíz A., Ortíz M., Lina L, Villalobos F. J., Peña G., Nuñez-Valdez M. E., Soberón M. and Quintero R. (1998) Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4965-4972.
- Burton S. L., Ellar D. J., Li J., Derbyshire D. J. (1999) N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J. Mol. Biol.* **287**, 1011-1022.
- Carroll J., Convents D., Van Damme J., Boets A., Van Rie J. and Ellar D. J. (1997) Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A δ -endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. *J. Invertebr. Pathol.* **70**, 41-49.
- Chandra A., Ghosh P., Mandaokar A. D., Bera A. K., Sharma R. P., Das S., Kumar P. A. (1999) Amino acid substitution in alpha-helix 7 of Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* leads to enhanced toxicity to *Helicoverpa armigera* Hubner. *FEBS Lett.* **458**, 175-179.
- Chen X. J., Lee M. K., Dean D. H. (1993) Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombyx mori* midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 9041-9045.
- Chestukhina G. G., Tyurin S. A., Kostina L. I., Osterman A. L., Zalunin I. A., Khodova O. A. and Stepanov V. M. (1990) Subdomain organization of *Bacillus thuringiensis* entomocidal proteins' N-terminal domains. *J. Protein Chem.* **9**, 501-507.

- Choma C. T., Surewicz W. K., Carey P. R., Pozsgay M., Raynor T. and Kaplan H. (1990) Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis*. Structural implications. *Eur. J. Biochem.* **189**, 523-527.
- Choe S., Bennett M. J., Fujii G., Curmi P. M., Kantardjieff K. A., Collier R. J., Eisenberg D. (1992) The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature.* **357**, 216-222.
- Convents D., Cherlet M., Van Damme J., Lasters I. and Lauwereys M. (1991) Two structural domains as a general fold of the toxic fragment of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Eur. J. Biochem.* **195**, 631-635.
- Crickmore N., Zeigler D. R., Feitelson J., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., Baum J. and Dean D. H. (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis*. pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 807-813.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A. and Dean, D. H. (2001) *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html.
- Cummings C. E., Armstrong G., Hodgman T. C., Ellar D. J. (1994) Structural and functional studies of a synthetic peptide mimicking a proposed membrane inserting region of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Mol. Membr. Biol.* **11**, 87-92.
- Dai S. M. and Gill S. S. (1993) *In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **23**, 273-283.
- Das P. K. and Amalraj D. D. (1997) Biological control of malaria vectors. *Indian J. Med. Res.* **106**:174-197
- De Maagd R. A., Bakker P., Staykov N., Dukiandjiev S., Stiekema W., Bosch D. (1999) Identification of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIC domain III amino acid residues involved in insect specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4369-4374.
- De Maio A. (1994) Protein blotting and immunoblotting using nitrocellulose membranes. In Dunbar D. S. (ed.), Protein blotting. A practical approach, pp. 11-32, Oxford University Press, USA.
- Dean D.H. (1984) Biochemical genetics of the bacterial insect-control agent *Bacillus thuringiensis*: Basic principles and prospects for genetic engineering. *Biotech. Gen. Eng. Rev.* **2**,
- Denolf P., Hendrickx K., Van Damme J., Jansens S., Peferoen M., Degheele D., Van Rie J. (1997) Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* **248**, 748-761.
- Dow J. A. T. (1992) pH gradients in lepidopteran midgut. *J. Exp. Biol.* **172**, 355-375.
- Dulmage H. T. (1978) Genetic manipulation of pathogens: selection of different strains. In M.A. Hoy and J.J. McKelvey (ed.) Genetics in relation to insect management, pp. 116-127, Rockefeller, New York
- Edwards D. L., Payne J. and Soares G. G. (1988) Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activities against nematodes. *European Patent Application*, EP 0 303 426 A2.
- English L. H., Readdy T. L. and Bastian A. E. (1991) Delta-endotoxin-induced leakage of $^{86}\text{Rb}^+ - \text{K}^+$ and H_2O from phospholipid vesicles is catalyzed by reconstituted midgut membrane. *Insect. Biochem.* **21**, 177-184.
- Estruch J. J., Warren G. W., Mullins M. A., Nye G. J., Craig J. A. and Koziel M. G. (1996) Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 5389-5394.
- Estruch J. J., Carozzi N. B., Desai N., Duck N. B., Warren G. W. and Koziel M. G. (1997) Transgenic plants: an emerging approach to pest control. *Nat. Biotechnol.* **15**, 137-141.
- Evans, H. F. (1997) The role of microbial insecticides in forest pest management, In British Crop Protection Council (ed.), Microbial insecticides: novelty or necessity? pp. 29-40, Symposium proceedings, no. 68. Major Desing & Production Ltd., Nottingham, United Kingdom.
- Feitelson J. S., Payne J and Kim L. (1992) *Bacillus thuringiensis*. Insect and beyond. *Bio/Technology* **10**, 271-275.
- Feitelson J. S. (1993) The *Bacillus thuringiensis* family tree. In L. Kim (ed.), Advanced engineered pesticides, pp. 63-71, Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
- Francis B. R. and Bulla L. A. (1997) Further characterization of BT-R1, the cadherin-like receptor for CryIAb toxin in tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midguts. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**, 541-550.
- Frutos R., Rang C., and Royer M. (1999) Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. *Crit. Rev. Biotechnol.* **19**, 227-276.

- García-Soto J., González-Martínez M., de la Torre L. and Darszon A. (1988) Sea urchin sperm head plasma membranes: characteristics and egg jelly induced Ca^{2+} and Na^{+} uptake. *Biochim. Biophys. Acta* **944**, 1-12.
- Gazit E., Bach D., Kerr I. D., Sansom M. S., Chejanovsky N., Shai Y. (1994) The alpha-5 segment of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: in vitro activity, ion channel formation and molecular modelling. *Biochem. J.* **304**, 895-902.
- Gazit E., LaRocca P., Sansom M. S. and Shai Y. (1998) The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 12289-12294.
- Gill S. S., Cowles E. A., Francis V. (1995) Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* **270**, 27277-27282.
- Gould F., Anderson A., Jones A., Sumerford D., Heckel D. G., Lopez J., Micinski S., Leonard R. and Laster M. (1997) Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 3519-3523.
- Grochulski P., Masson L., Borisova S., Pusztai-Carey M., Schwartz J.L., Brousseau R. and Cygler M. (1995) *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: Crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* **254**, 447-464.
- Güereca L. and Bravo A. (1999) The oligomeric state of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in solution. *Biochim. Biophys. Acta* **1429**, 342-350.
- Guillet P., Kurtak D. C., Philippon B. and Meyer R. (1990) Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* for Onchocerciasis control in West Africa. In de Barjac H. and Sutherland D. (eds.) Bacterial control of mosquitoes and blackflies: Biochemistry, Genetics and applications of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus*. pp. 187-201, Rutgers University Press, New Brunswick.
- Haider M. Z. and Ellar D. J. (1989) Functional mapping of an entomocidal δ -endotoxin. Single amino acid changes produce by site directed mutagenesis influence toxicity and specificity of the protein. *J. Mol. Biol.* **208**, 183-194.
- Haider M. Z. and Ellar D. J. (1989b) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxin: interaction with phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **978**, 216-222.
- Haider M. Z., Smith G. P. and Ellar D. J. (1989) Delineation of the toxin coding fragments and an insect-specificity region of a dual toxicity *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **49**, 157-163.
- Hail R. S. (2000) Genetically modified plants – the debate continues. *Trends Ecol. Evol.* **15**, 14-18.
- Harlow E. and Lane D. (1988) In: *Antibodies. A Laboratory Manual*, pp. 597, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Harr J., Gugenheim R., Boller T. and Oerth J. J. (1980) High pH values on the leaf surface of commercial cotton varieties. *Cot. Fib. Trop.* **35**, 379-384.
- Hilbeck A., Moar W. J., Pusztai-Carey M., Filippini A. and Bigler F. (1999) Prey-mediated effects of CryIAb toxin and protoxin and Cry2A protoxin on the predator *Chrysoperla carnea*. *Entomologia Experimentalis Applicata*. **91**, 305-316.
- Hille B. (1992) Ionic channels of excitable membranes. 2nd edition. Sinauer associates Inc. Sunderland, MA, USA.
- Hodgman T. C. and Ellar D. J. (1990) Model for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins determined by computational analysis. *J. DNA Seq. Map.* **1**, 97-106.
- Höfte H., Van Rie J., Jansens S., Van Houtven A., Vanderbruggen H. and Vaeck M. (1988) Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2010-2017.
- Hofte H., Whiteley H. R. (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**, 242-55.
- Iriarte J., Bel Y., Ferrandis M. D., Andrew R., Murillo J., Ferré J. And Caballero P. (1998) Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain. *System. Appl. Microbiol.* **21**, 97-106.
- Jenkins J. L., Lee M. K., Valaitis A. P., Curtiss A., Dean D. H. (2000) Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 14423-14431.
- Jurat-Fuentes J. L., Adang M. J. (2001) Importance of CryI delta-endotoxin domain II loops for binding specificity in *Heliothis virescens* (L.). *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 323-329.

- Keller M., Sneh B., Strizhov N., Prudovsky E., Regev A., Koncz C., Schell J. and Zilberstein A. (1996) Digestion of δ -endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**, 365-373.
- Kim H.S. (2000) Comparative study of the frequency, flagellar serotype, crystal shape, toxicity, and cry gene contents of *Bacillus thuringiensis* from three environments. *Curr. Microbiol.* **41**, 250-256.
- Klonis N., Clayton A. H., Voss E. W. Jr., Sawyer W. H. (1998) Spectral properties of fluorescein in solvent-water mixtures: applications as a probe of hydrogen bonding environments in biological systems. *Photochem. Photobiol.* **67**, 500-510.
- Knight P. J. K., Crickmore N. and Ellar D. J. (1994) The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* **11**, 429-436.
- Knowles B. H. (1994) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins. *Adv. Insect. Physiol.* **24**, 275-308.
- Knowles B. H. and Ellar D. J. (1987) Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta* **924**, 509-518.
- Komano T. M., Yamagiwa T., Nishimoto H., Yoshisue H., Tanabe K., Sen K. and Sakai H. (1998) Activation process of the insecticidal proteins CryIVA and CryIVB produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Isr. J. Entomol.* **32**, 185-198.
- Lakowicz J. R. (1983) Principles of fluorescence spectroscopy. Pp. 496 Plenum Press, NY.
- Lambert B., Buysse L., Decock C., Jansens S., Piens C., Saey B., Seurinck J., Van Audenhove K., Van Rie J., Van Vliet A. and Peferoen M. (1996) A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 80-86.
- Lee M. K., Young B. A., Dean D. H. (1995) Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 306-312.
- Lereclus D., Agaisse H., Gominet M. and Chaufaux M. (1995) Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* *spoOA* mutant. *Bio/technology* **13**, 67-71.
- Li J., Carroll J. and Ellar D. J. (1991) Crystal structure of intestinal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, **353**, 815-821.
- Lightwood D. J., Ellar D. J. and Jarrett P. (2000) Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* CryIAc δ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5174-5181.
- Lorence A., Darszon A., Díaz C., Liébano A., Quintero R. and Bravo A. (1995) δ -Endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* **360**, 217-222.
- Lorence A., Darszon A. and Bravo A. (1997) The pore formation activity of *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin on *Trichoplusia ni* membranes depends on the presence of aminopeptidase N. *FEBS Lett.* **414**, 303-307.
- Lu H., Rajamohan F. and Dean D. H. (1994) Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(a) associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. *J. Bacteriol.* **176**, 5554-5559.
- Luo K., Sangadala S., Masson L., Mazza A., Brousseau R., Adang M. J. (1997) The *Heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase functions as "receptor A" by mediating specific *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxin binding and pore formation. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **27**, 735-743.
- Lüthy P. (1986) Insect pathogenic bacteria as pest control agents. In Franz (ed.) Biological plant and health protection, pp. 201-216, Fisher Verlag, Stuttgart, New York.
- MacIntosh S. C., Kishore G. M., Perlak F. J., Marrone P. G., Stone T. B., Sims S. R. and Fuchs R. L. (1990) Potentiation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity by serine protease inhibitor. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1145-1152.
- Martin P. A. W. and Travers R. S. (1989) Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2437-2442.
- Martinez-Ramírez A. C. and Real M. D. (1996) Proteolytic processing of *Bacillus thuringiensis* CryIIIA toxin and specific binding to brush border membrane vesicles of *Lepinotarsa decemlineata* (Colorado potato beetle). *Pest. Biochem. Physiol.* **54**, 115-122.
- Masson L., Mazza A., Gringorten L., Baines D., Aneliunas V. and Brousseau R. (1994) Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin is highly dependent on the bioassay system. *Mol. Microbiol.* **14**, 851-860.

- Masson L., Tabashnik B. E., Liu Y. B., Brousseau R., Schwartz J. L. (1999) Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin lines the lumen of the ion channel. *J. Biol. Chem.* **274**, 31996-32000.
- McGaughey W. H. and Whalton M. E. (1992) Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science* **258**, 1451-1455.
- Meza R., Nunez-Valdez M. E., Sanchez J. and Bravo A. (1996) Isolation of CryIAb protein mutants of *Bacillus thuringiensis* by a highly efficient PCR site-directed mutagenesis system. *FEMS Microbiol. Lett.* **145**, 333-339.
- Nagamatsu Y., Koike T., Sasaki K., Yoshimoto A., Furukawa Y. (1999) The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin. *FEBS Lett.* **460**, 385-390.
- Nagamatsu Y., Toda S., Yamaguchi F., Ogo M., Kogure M., Nakamura M., Shibata Y., Katsumoto T. (1998) Identification of *Bombyx mori* midgut receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 718-726.
- Nishimoto T., Yoshisue H., Ihara K., Sakai H., Komano T. (1994) Functional analysis of block 5, one of the highly conserved amino acid sequences in the 130-kDa CryIVA protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEBS Lett.* **348**, 249-254.
- Ogiwara K., Indrasith L. S., Asano S. and Hori H. (1992) Processing of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **60**, 121-126.
- Oppert B., Kramer K. J., Beeman R. W., Johnson D. and McGaughey W. H. (1997) Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Biol. Chem.* **272**, 23473-23476.
- Pang A. S., Gringorten J. L. and Bai C. (1999) Activation and fragmentation of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by high concentrations of proteolytic enzymes. *Can. J. Microbiol.* **45**, 816-825.
- Parker M. W. and Pattus F. (1993) Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 391-395.
- Payne J. M., Kennedy M. K., Randall J. B. and Meier H. (1993) U.S. Patent 5,262,159.
- Pietrantonio P. V. and Gill S. S. (1996) *Bacillus thuringiensis* endotoxins: action on the insect midgut. In M. J. Lehane and P. F. Billingsley (eds.) *Biology of the insect midgut*, pp. 345-372, Chapman & Hall, London.
- Powell K. A. (1993) The commercial exploitation of microorganisms in agriculture. In D. G. Jones (ed.) *Exploitation of microorganisms*, pp. 441-459, Chapman and Hall, London, England.
- Pusztai M., Fast P., Gringorten L., Kaplan H., Lessard T., Carey P. R. (1991) The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochem. J.* **273**, 43-47.
- Rausell C., Martinez-Ramirez A. C., Garcia-Robles I. and Real M. D. (2000) A binding site for *Bacillus thuringiensis* CryIAb toxin is lost during larval development in two forest pests. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1553-1558.
- Rajamohan F., Hussain S. R., Cottrill J. A., Gould F., Dean D. H. (1996) Mutations at domain II, loop 3, of *Bacillus thuringiensis* CryIAa and CryIAb delta-endotoxins suggest loop 3 is involved in initial binding to lepidopteran midguts. *J. Biol. Chem.* **271**, 25220-25226.
- Rukmini V., Reddy C. Y. and Venkateswerlu G. (2000) *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: Role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. *Biochimie* **82**, 109-116.
- Sanchis V., Gohar M., Chaufaux J., Arantes O., Meier A., Agaisse H., Cayley J., Lereclus D. (1999) Development and field performance of a broad-spectrum nonviable asporogenic recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* with greater potency and UV resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4032-4039.
- Sangadala S., Walters F. S., English L. H., Adang M. J. (1994) A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and 86Rb(+)-K⁺ efflux *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **269**, 10088-10092.
- Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D. R. and Dean D. H. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 775-806.
- Schnepf H. E. and Whiteley H. R. (1981) Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 2893-2897.
- Schuler T. H., Potting R. P., Denholm I., Poppy G. M. (1999) Parasitoid behaviour and *Bt* plants. *Nature*. **400**, 825-826.
- Schwartz J. L., Juteau M., Grochulski P., Cygler M., Prefontaine G., Brousseau R. and Masson L. (1997a) Restriction of intramolecular movements within the CryIAa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. *FEBS Lett.* **410**, 397-402.

- Schwartz J. L., Lu Y. J., Sohnlein P., Brousseau R., Laprade R., Masson L., Adang M. J. (1997b) Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. *FEBS Lett.* **412**, 270-276.
- Sepulveda-Becerra M. A., Ferreira S. T., Strasser R. J., Garzon-Rodriguez W., Beltran C., Gomez-Puyou A., Darszon A. (1996) Refolding of triosephosphate isomerase in low-water media investigated by fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry* **35**, 15915-15922.
- Shao Z., Cui Y., Liu X., Yi H., Ji J. and Yu Z. (1998) Processing of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 in *Heliothis armigera* midgut juice and the effects of protease inhibitors. *J. Invertebr. Pathol.* **72**, 73-81.
- Siegel J. P. (2001) The Mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*- based insecticides. *J. Invertebr. Pathol.* **77**, 13-21.
- Simpson R. M., Newcomb R. D. (2000) Binding of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins Cry1Ac and Cry1Ba to a 120-kDa aminopeptidase-N of *Epiphyas postvittana* purified from both brush border membrane vesicles and baculovirus-infected Sf9 cells. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **30**, 1069-1078.
- Smedley D. P., Armstrong G. and Ellar D. J. (1997) Channel activity caused by *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin preparation depends on the method of activation. *Mol. Memb. Biol.* **14**, 13-18.
- Smith G. P. and Ellar D. J. (1994) Mutagenesis of two surface-exposed loops of the *Bacillus thuringiensis* CryIC delta-endotoxin affects insecticidal specificity. *Biochem. J.* **302**, 611-616.
- Soberón M., Pérez R. V., Nuñez-Valdez M. E., Lorence A., Gómez I., Sánchez J., Bravo A. (2000) Evidence for intermolecular interaction as a necessary step for pore-formation activity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEMS Microbiol. Lett.* **191**, 221-225.
- Tabashnik B. E., Cushing N. L., Finson N. and Johnson M. W. (1990) Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* **83**, 1671-1676.
- Tabashnik B. E., Patin A. L., Dennehy T. J., Liu Y. B., Carriere Y., Sims M. A. and Antilla L. (2000) Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 12980-12984.
- Tang J. D., Collins H. L., Metz T. D., Earle E. D., Zhao J. Z., Roush R. T. and Shelton A. M. (2001) Greenhouse tests on resistance management of *Bt* transgenic plants using refuge strategies. *J. Econ. Entomol.* **94**, 240-247.
- Thomas W. E. and Ellar D. J. (1983) *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal δ -endotoxin: effect in insect and mammalian cells *in vitro*. *J. Cell. Sci.* **60**, 181-197.
- Thomas W. E. and Ellar D. J. (1983b) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* insecticidal δ -endotoxin. *FEBS Lett.* **154**, 362-268.
- Vadlamudi R. K., Ji T. H. and Bulla L. A. (1993) A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. *J. Biol. Chem.* **268**, 12334-12340.
- Vadlamudi R. K., Weber E., Ji I., Ji T. H. and Bulla L.A. (1995) Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **270**, 5490-5494.
- Valaitis A. P., Lee M. K., Rajamohan F., Dean D. H. (1995) Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for the CryIA(c) delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**, 1143-1151.
- Van Rie J., McGaughey W. H., Johnson D.E., Barnett B. D. and Van Mellaert H. (1990) Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide. *Science* **247**, 72-74.
- Vanková J. (1978) The heat-stable exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Folia Microbiol.* **23**, 162-174.
- Von Tersch M. A., Slatin S. L., Kulesza C. A., English L. H. (1994) Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIB2 and CryIIIB2 domain I peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3711-3717.
- Walters F. S., Slatin S. L., Kulesza C. A., English L. H. (1993) Ion channel activity of N-terminal fragments from CryIA(c) delta-endotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 921-926.
- Whiteley H. R. and Schnepf H. E. (1986) The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Microbiol.* **40**, 549-576.
- Wolfersberger M., Lüthy P., Maurer A., Parenti F., Sacchi V., Giordana B. and Hanozet G. M. (1987) Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* **86A**, 301-308.
- Yaoi K., Kadotani T., Kuwana H., Shinkawa A., Takahashi T., Iwahana H., Sato R. (1997) Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Eur. J. Biochem.* **246**, 652-657.

- Yamagiwa M., Esaki M., Otake K., Inagaki M., Komano T., Amachi T. and Sakai H. (1999) Activation process of dipteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *App. Environ. Microbiol.* **65**, 3464-3469.
- Yu C. G., Mullins M. A., Warren G. W., Koziel M. G. and Estruch J. J. (1997) The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 532-536.
- Yunovitz H. and Yawetz A. (1988). Interaction between the delta-endotoxins produced by *Bacillus thuringiensis* ssp. *entomocidus* and liposomes. *FEBS Lett.* **230**, 105-108.
- Zalunin I. A., Revina L. P., Kostina L. I., Chestukhina G. G. and Stepanov V. M. (1998) Limited proteolysis of *Bacillus thuringiensis* CryIG and CryIVB δ -endotoxins leads to formation of active fragments that do not coincide with the structural domains. *J. Protein Chem.* **17**, 463-471.



Pergamon

Insect Biochemistry and Molecular Biology •• (2001) ••–••

Insect
Biochemistry
and
Molecular
Biology

www.elsevier.com/locate/ibmb

Processing of CryIAb δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation

Raul Miranda, Fernando Zamudio, Alejandra Bravo *

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca 62250, Mor. Mexico

Received 15 November 2000; received in revised form 22 February 2001; accepted 26 February 2001

Abstract

Activation of Cry protoxins is carried out by midgut proteases. This process is important for toxicity and in some cases for specificity. Commercial proteases have been used for in vitro protoxin activation. In the case of CryIA protoxins, trypsin digestion generates a toxic fragment of 60–65 kDa. Here, we have analyzed the in vitro and in vivo activation of CryIAb. We found differences in the processing of CryIAb protoxin by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases as compared to trypsin. Midgut juice proteases produced two additional nicks at the N-terminal end removing helices $\alpha 1$ and $\alpha 2a$ to produce a 58 kDa protein. A further cleavage within domain II splits the toxin into two fragments of 30 kDa. The resulting fragments were not separated, but instead coeluted with the 58 kDa monomer, in size-exclusion chromatography. To examine if this processing was involved in the activation or degradation of CryIAb toxin, binding, pore formation, and toxicity assays were performed. Pore formation assays showed that midgut juice treatment produced a more active toxin than trypsin treatment. In addition, it was determined that the $\alpha 1$ helix is dispensable for CryIAb activity. In contrast, the appearance of the 30 kDa fragments correlates with a decrease in pore formation and insecticidal activities. Our results suggest that the cleavage in domain II may be involved in toxin inactivation, and that the 30 kDa fragments are stable intermediates in the degradation pathway. © 2001 Published by Elsevier Science Ltd.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; Protoxin activation; Toxin degradation; Midgut proteases; Mode of action

1. Introduction

During sporulation, *Bacillus thuringiensis* (Bt) produces insecticidal crystal proteins (ICPs), also called δ -endotoxins or Cry toxins. Although each of these toxins has a narrow spectrum of specificity, the Cry toxin family covers many insect orders and other invertebrates (Crickmore et al., 1998). After ingestion by susceptible larvae, crystals are solubilized in the midgut environment and protoxins are activated by midgut proteases. The activated toxins bind to receptors located in the midgut brush border membrane and, after membrane insertion, they make low-selective ion pores (Lorence et al., 1995). The resulting permeability produces ionic and

water flow, that leads to cell lysis and insect death (Schnepf et al., 1998).

When sorted by molecular weight, Cry protoxins are grouped as either 130–135 kDa or as the naturally truncated 70–73 kDa proteins (Rukmini et al., 2000). Independent of their size, activation by proteolytic digestion is an indispensable event in their mode of action. A time course study of 130 kDa protoxin digestion revealed that the toxin is generated by proteolytic cleavages, occurring in a sequential manner and starting from the C-terminus (Choma et al., 1990). Also, a short peptide at the N-terminal end is removed from the 130 and 70 kDa Cry protoxins (Choma et al., 1990; Schnepf et al., 1998) resulting in the production of 60–65 kDa toxins.

Intramolecular processing has been reported for several Cry toxins. CryIAb (Convents et al., 1991), Cry2Aa (Audtho et al., 1999), Cry3A (Carroll et al., 1997), Cry4Aa (Yamagiwa et al., 1999), Cry4B, and Cry9Aa (Zalunin et al., 1998) are cleaved within domain I, while

* Corresponding author. Tel.: +52-73-297635; fax: +52-73-172388.
E-mail address: bravo@ibt.unam.mx (A. Bravo).

CryIIAa (Dai and Gill, 1993), CryIAc (Choma et al., 1990) and CryIAa (Pang et al., 1999) are cleaved within domain II. The *in vivo* activation process is not clear and could vary because of differences in insect midgut proteases.

With the aim of better understanding the role of midgut proteases in the activation of Cry protoxins, we studied the proteolysis of CryIAb by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut juice using *in vivo* and *in vitro* conditions. This work was done with the supposition that the midgut juice of the target insect contains all of the necessary proteases and environment conditions for efficient activation of Cry protoxins. We found that, in contrast to the trypsin activation, the midgut protease treatment produced lower molecular mass proteins by proteolytic cleavages inside the toxic fragment. Two additional nicks at the N-terminal end were identified, which removed helices $\alpha 1$ and $\alpha 2a$. A further cleavage within domain II splits the toxin into two fragments of 30 kDa. To understand if the intramolecular cleavages of CryIAb are involved in the activation or in the degradation pathway, functional assays of the different steps in the mode of action of Cry toxins were conducted with the processed toxins. We concluded that the processing of helix $\alpha 1$ is part of the activation mechanism of CryIAb toxin, whereas cleavage in domain II inactivated the toxin. The generated 30 kDa fragments are stable intermediates in the degradation pathway.

2. Materials and methods

2.1. CryIAb δ -endotoxin purification

CryIAb crystals were produced in the acrySTALLIFEROUS *Bt* strain 407cry⁻ transformed with pHT315 plasmid (Arantes and Lereclus, 1991) harboring the cryIAb gene (pHT315-1Ab). The transformant strain was grown for 3 days at 29°C in nutrient broth sporulation medium (Lereclus et al., 1995) supplemented with 10 μ g/ml erythromycin. After complete sporulation, crystals were purified by sucrose gradients as reported (Thomas and Ellar, 1983). CryIAb crystals were solubilized in 50 mM Na₂CO₃ pH 10.5, 0.2% β -mercaptoethanol at 37°C for 2 h.

Protoxin (20 μ g) was digested with trypsin (37°C) or *M. sexta* or *S. frugiperda* midgut juices (30°C), at different protease/protoxin ratios for 2 or 13 h. Protoxin digestion was stopped with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Samples were centrifuged at 16,000g for 10 min and the toxin-containing supernatant was harvested. Protein concentration was determined using the Bio-Rad Protein assay (Bio-Rad Labs, Hercules, CA).

For *in vivo* processing of CryIAb, fifth instar larvae of *M. sexta* were force-fed with 10 μ g of protoxin. After

several post-feeding times, midgut tissue was dissected and the soluble fraction of the food bolus and solid material were separated by centrifugation. Samples were separated by sodium dodecyl sulfate 10% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Protein was transferred onto nitrocellulose and immunodetected with a polyclonal anti-CryIA toxin antibody (1/10,000) (Bravo et al., 1992).

2.2. Midgut juice isolation and brush border membrane vesicles (BBMV) purification

M. sexta eggs were kindly supplied by Dr Jorge Ibarra (CINVESTAV-IPN, Mexico). *S. frugiperda* and *M. sexta* larvae were reared on an artificial diet as described (Bell and Joachim, 1976). Fifth instar *M. sexta* and *S. frugiperda* larvae were chilled 10 min on ice and midgut tissue was dissected. Midgut juice from both larvae was separated from solid material by centrifugation and filtered through 0.22 μ m filters. Total protein was determined and small aliquots of midgut juice were stored at -70°C until use.

BBMV were prepared with the method of differential precipitation with MgCl₂ as reported by Wolfersberger et al. (1987), with a final step dialysis against 400 volumes of 150 mM KCl, 10 mM HEPES-HCl pH 7.4 (Sigma, St. Louis, MO). Protein content of BBMV was assayed with the Folin-Ciocalteu reagent (Sigma, St. Louis, MO) in the presence of 0.75% SDS. BBMV enrichment was estimated according to the ratio of alkaline phosphatase (AP), aminopeptidase N (APN) and cytochrome *c* oxidase activities, relative to the initial homogenate (7–10-fold increase AP and APN/mg protein). Cytochrome *c* oxidase activity was determined to ensure that BBMV were not contaminated with mitochondrial membranes, by using horse heart reduced cytochrome *c* acid-modified as substrate, in a double beam SIM Aminco DW-2000 (García-Soto et al., 1988). APN activity was assayed using L-leucine-*p*-nitroanilide as substrate (Lorence et al., 1997) and AP using *p*-nitrophenyl phosphate as substrate (Harlow and Lane, 1988).

2.3. N-terminal sequencing

CryIAb toxin was digested with *M. sexta* midgut juice, separated by 10% SDS-PAGE and transferred onto an Immobilon-P^{SO} PDVF membrane (Millipore Co., Bedford, MA), in a semidry transfer chamber as directed by the manufacturer. Protein was developed with 0.1% Ponceau S dye (Sigma, St. Louis, MO) and selected bands were excised for N-terminal sequencing on the 6400/6600 Milligen/Bioscience Prosequencer, at our institute.

2.4. Size-exclusion and ion-exchange chromatography

Cry1Ab toxin, previously digested with *M. sexta* midgut juice, was separated by Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) FPLC size-exclusion or HiTrap Q (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) ion-exchange chromatography, as previously described (Güereca and Bravo, 1999). Eluted toxin from both columns was separated by 10% SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane, detected with anti-Cry1Ab polyclonal antibody (1/10,000; 1 h) and visualized by incubating with a goat anti-rabbit secondary antibody coupled with horseradish peroxidase (Sigma, St. Louis, MO) (1/1000; 1 h), followed by incubation with SuperSignal chemiluminescent substrate (Pierce, Rockford, IL), as described by the manufacturers. In the case of ion-exchange chromatography, domain I was detected with the 4D6 monoclonal antibody (1/5000; 1 h) that recognizes amino acids 164–222 of Cry1Ab (Höfte et al., 1988) and a rabbit anti-mouse antibody also coupled with horseradish peroxidase (Sigma, St. Louis, MO) (1/1000; 1 h).

2.5. Binding assays

Trypsin- and midgut juice-digested protoxins were tested for binding to BBMV as reported (Aranda et al., 1996). BBMV protein (20 µg) were incubated with 10 nM Cry1Ab toxin in 100 µl binding buffer (PBS, 0.1% w/v BSA, 0.1% v/v Tween-20, pH 7.6) for 1 h. The unbound toxin was removed by centrifugation (10 min at 14,000g) and washing twice with the same buffer (500 µl). Finally, the BBMV were suspended in 10 µl of PBS, pH 7.6, and an equal volume of Laemmli sample loading buffer (2X) was added. Samples were boiled for 5 min, separated by 10% SDS-PAGE, and electro-transferred to nitrocellulose membranes. The Cry1Ab toxin that remained bound to the vesicles was visualized by incubating with anti-Cry1Ab polyclonal antibody and a goat anti-rabbit secondary antibody coupled with horseradish peroxidase, followed by incubation with the SuperSignal chemiluminescent substrate, as described above.

2.6. Fluorescence measurements

Pore formation activity was assayed by monitoring changes in membrane potential with the fluorescent positively charged dye, 3,3'-dipropylthiodicarbocyanine (Dis-C₃(5)), (Molecular Probes, Eugene, OR) as previously described (Lorence et al., 1995). Fluorescence was recorded at 620–670 nm in a Hansatech system (Norfolk, England). Hyperpolarization causes dye internalization into the BBMV and a decrease in fluorescence; depolarization causes the opposite effect. BBMV (10 µg) previously loaded with 150 mM KCl was suspended in

900 µl of 150 mM *N*-methyl-D-glucamine chloride (MeGluCl), 10 mM HEPES-HCl pH 9 buffer. After equilibration of the dye (2 min), 50 nM Cry1Ab toxin was added. Changes in membrane potential were monitored by successive additions of KCl (7, 22, 47, 98 and 195 mM) to the BBMV suspension. Analyses of the slope (*m*) of ΔF (%) vs. K⁺ equilibrium potential (E_{K^+}) (mV) curve are reported in this work. E_{K^+} was calculated using the Nernst equation. Membrane potential determinations were done four times.

2.7. Bioassays

Insect toxicity of digested protoxins was assayed with first instar *M. sexta* larvae by the diet-surface contamination procedure. A constant volume of the sample dilution (35 µl) was applied onto the diet surface contained in 24-well polystyrene plates (Cell Wells, Corning Glass Works, Corning New York 14831). One first instar larva was added per well and one 24-well plate was used per toxin concentration. The plates were incubated at 28°C, 65±5% of relative humidity, and a light:dark photoperiod of 16:8 h. Mortality was recorded after 7 days.

3. Results

3.1. Midgut juice and trypsin digestion of solubilized Cry1Ab protoxin

We hypothesized that midgut juice of susceptible insects have all of the necessary components to activate Cry protoxins. *M. sexta* is highly susceptible to Cry1Ab toxin, but *S. frugiperda* is not susceptible (Aranda et al., 1996). Analyses of Cry1Ab digestion with trypsin or midgut juice of *M. sexta* (protease/protoxin ratio of 1/50 w/w) were done. The product of trypsin digestion was a major band of 62 kDa that remained stable for 13 h of incubation. In contrast, after 2 h of *M. sexta* midgut juice treatment, a doublet of 60 and 58 kDa and a third 30 kDa minor band appeared. After 13 h of incubation, the intensity of higher molecular mass proteins decreased, while that of the 30 kDa fragment increased (Fig. 1A). The production of the 30 kDa fragment was analyzed after 2 h of digestion with different protease/protoxin ratios using midgut juices from *M. sexta* and *S. frugiperda* larvae in comparison with trypsin (Fig. 1B). With a 1:1000 dilution of *M. sexta* and *S. frugiperda* midgut enzymes, the first intramolecular cleavage produced a doublet of 62 and 60 kDa. As the ratio of midgut protease/protoxin logarithmically increased, more differences in the 10% SDS-PAGE banding pattern were observed. With a 1:100 dilution a second cleavage occurred to produce a 58 kDa band, while the amount of the 62 kDa protein decreased. Finally, with 1:10 and 1:2 dilutions, two fragments of ~30 kDa were produced. In contrast, high con-

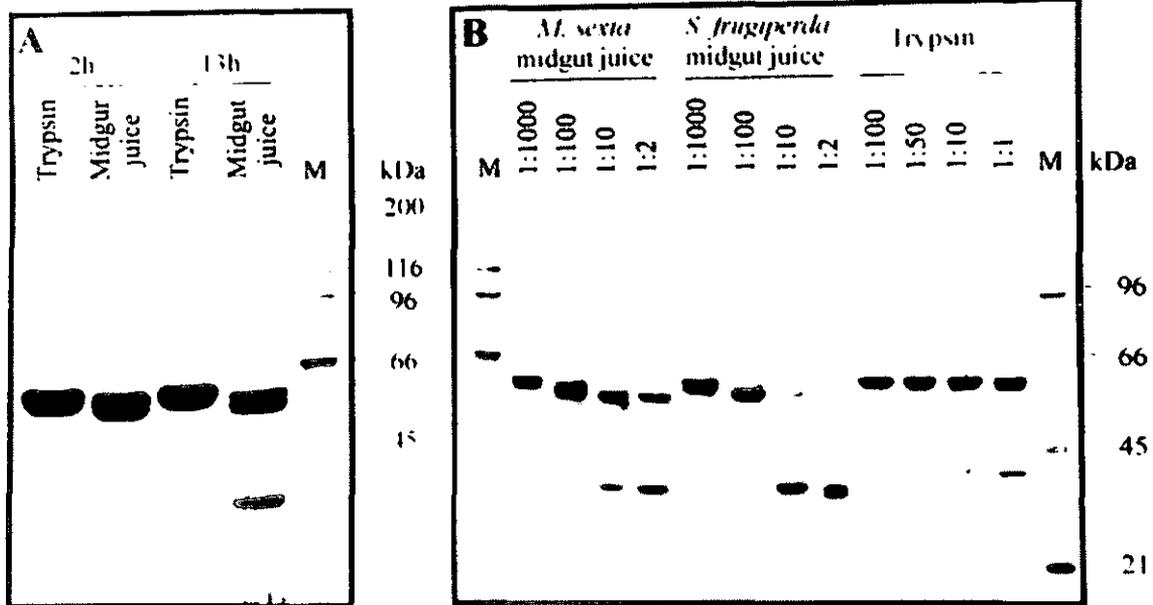


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of proteins from Cry1Ab digestion with trypsin, or with *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut juice proteases. SDS-PAGE of the protease-resistant fragments obtained after digestion of Cry1Ab protoxin, stained with Coomassie brilliant blue. M, molecular mass markers. (A) 2 and 13 h digestion of Cry1Ab with trypsin (protease/protoxin ratio of 1/50 w/w) or *M. sexta* midgut juice (0.4 µg). (B) 2 h digestion of Cry1Ab with different protease/protoxin ratios.

centrations of trypsin (1/10 or 1/1) produced both a 62 kDa major band and a 33 kDa minor band. Fig. 1B shows that proteolytic digestion of Cry1Ab protoxin is more effective in *S. frugiperda* than in *M. sexta* midgut juice.

3.2. Digestion of Cry1Ab in vivo

To determine if the 30 kDa fragments were also produced in vivo, fifth instar *M. sexta* larvae were force-fed with Cry1Ab protoxin. After feeding, midgut tissue was dissected, and the presence of protoxin and toxin was assayed by Western blotting using an anti-Cry1A polyclonal antibody. The in vivo production of the 30 kDa fragments was observed after 15 min and up to 4 h while the amount of the 58 kDa protein decreased (Fig. 2).

3.3. Association of intramolecularly cleaved Cry1Ab 30 kDa fragments

Cry1Ab protoxin digested with *M. sexta* midgut juice (1:10) was added to a Superdex 200 size-exclusion column. Fractions of 1 ml were collected and analyzed by Western blotting with the polyclonal anti-Cry1A antibody. As shown in Fig. 3A, the 30 kDa fragments coeluted with the 58 kDa monomer. This result suggests that these polypeptides are joined by non-covalent bonds and that the midgut juice treatment does not unfold the

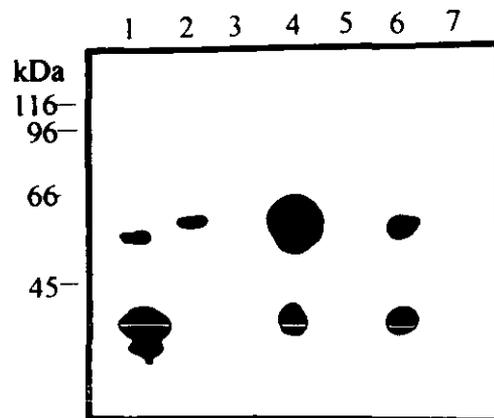


Fig. 2. Western blot of proteins from in vivo activation of Cry1Ab protoxin. Fifth instar *M. sexta* larvae were fed with 10 µg Cry1Ab protoxin. After 15 min (lane 4) or 4 h (lane 6), midgut tissue was dissected. Samples were subjected to SDS-PAGE and the toxin was detected by Western blotting with an anti-Cry1A polyclonal antibody. Lane 1, Cry1Ab protoxin digested 13 h in vitro with *M. sexta* midgut juice (1:10 w/w); lane 2, protoxin digested 13 h in vitro with trypsin (1:50 w/w); lane 7, control insect. The numbers alongside the gel indicate the molecular masses (kDa) of standard marker proteins.

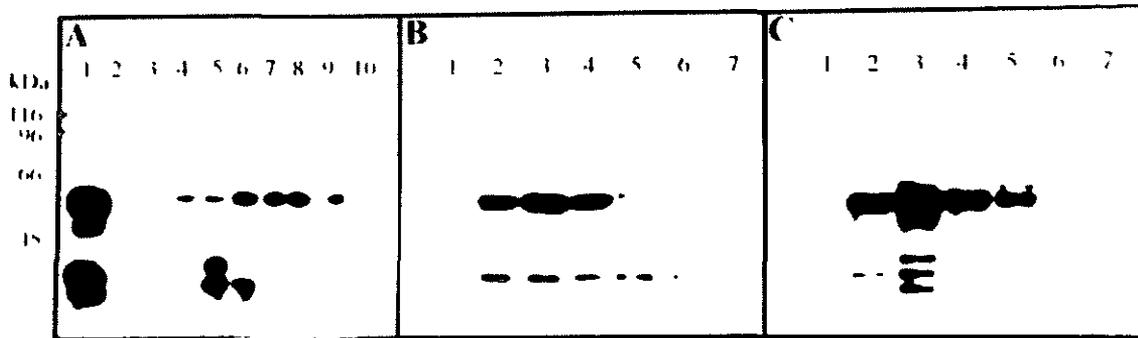


Fig. 3. Western blot of the elution profiles of CryIAb toxin digested with *Manduca sexta* midgut juice treatment, after (A) size-exclusion and (B and C) HiTrap ion-exchange chromatography. (A) Size-exclusion chromatography on a Superdex H-200 column. Samples were subjected to SDS-PAGE and the toxin was detected by Western blotting with an anti-CryIA polyclonal antibody. (B) HiTrap ion-exchange chromatography with a linear gradient of 50–400 mM NaCl, in 50 mM Tris–HCl pH 8.5. Samples were subjected to SDS-PAGE and the toxin was detected by Western blotting with an anti-CryIA polyclonal antibody. (C) HiTrap ion-exchange chromatography as in (B). Samples were subjected to SDS-PAGE and the toxin was detected by Western blotting with the 4D6 monoclonal antibody that recognizes domain I from CryIAb. The numbers alongside the gel indicate molecular masses (kDa) of standard marker proteins.

actual structure of the protein but only makes some peptide bond cleavages.

To identify the domains of the toxin present in the 30 kDa protein, the midgut juice-digested CryIAb protoxin was loaded onto a HiTrap Q ion-exchange column, previously equilibrated with 50 mM NaCl, 50 mM Tris–HCl pH 8.5. The protein was eluted using a linear gradient of 50–400 mM NaCl, in 50 mM Tris–HCl pH 8.5. Fractions were collected and analyzed by Western blotting using two different antibodies, a polyclonal anti-CryIA antibody (Fig. 3B) and the 4D6 monoclonal antibody that recognizes an epitope within domain I (Fig. 3C). Fig. 3B shows that the 30 kDa protein coeluted with the 58 kDa toxin at around 0.25 mM NaCl, as detected by the polyclonal anti-CryIA antibody (Fig. 3B). However, when the same fractions were tested with the 4D6 MAb, the 30 kDa protein of only some of the fractions cross-reacted with this antibody (Fig. 3C). These results suggested that two different 30 kDa fragments were produced by the midgut protease treatment, one fragment containing domain I or part of it, and the second fragment containing the rest of the toxin.

3.4. Functional studies of processed CryIAb toxin

To determine if the processing of CryIAb protoxin was involved in toxicity to *M. sexta* or in the degradation pathway within the insect midgut, functional studies of the different steps in the mode of action of Cry toxins were carried out with midgut juice-activated toxin, and compared with trypsin-activated toxin.

CryIAb toxin obtained by digestion at different midgut juice/protoxin ratios was tested for binding to *M. sexta* BBMVs. At a ratio of 1:100, when no 30 kDa fragment was obtained, only the 58 kDa toxin was bound

(Fig. 4). However, at midgut juice/protoxin ratios of 1:50 and 1:10 where the 30 kDa protein appeared, both the 58 and 30 kDa polypeptides were bound. Thus, the intramolecular cleavage that yields the 30 kDa fragment does not affect the binding of the fragments to BBMVs.

To analyze the effect of midgut juice treatment on the activation of CryIAb protoxin, *in vitro* K⁺ permeability assays were performed as previously reported (Lorence

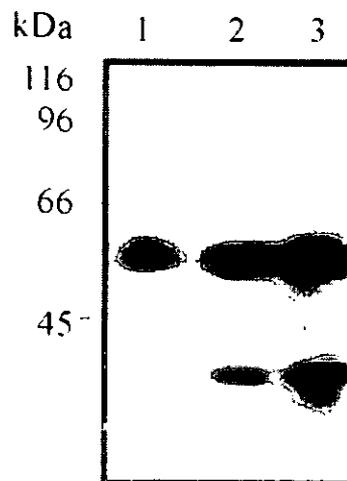


Fig. 4. Binding of CryIAb toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles after digestion with *M. sexta* midgut juice. CryIAb protoxin was digested at different midgut juice/protoxin ratios and incubated with 20 μ g of BBMVs. After 1 h incubation, unbound toxins were removed and vesicles containing bound toxins were subjected to SDS-PAGE, blotted onto a nitrocellulose membrane, and detected with the polyclonal anti-CryIA antibody. Lane 1, 1:100 ratio; lane 2, 1:50 ratio; lane 3, 1:10 ratio. The numbers alongside the gel indicate molecular masses (kDa) of standard marker proteins.

et al., 1995). Fig. 5A shows that moderate midgut protease extract treatment (2 h at 1:1000 dilution) enhanced the activity of Cry1Ab for in vitro K^+ permeability. Addition of 50 nM of the activated toxin to BBMVs, loaded with 150 mM KCl and suspended in 150 mM MeGluCl, produced a fast hyperpolarization. The response of the dye to KCl additions also increased, when compared to the control in which the same amount of buffer was added. After each KCl addition a new membrane potential was established, and a depolarization was produced. Fig. 5B shows the slope of the changes in fluorescence vs. K^+ equilibrium potential. The same analysis was done with the activated toxin by different treatments (Table 1). The K^+ permeability obtained with a moderate midgut protease extract treatment (2 h at 1:1000 dilution) was 5-fold higher than that obtained by the trypsin activation treatment (2 h at 1:100 dilution) (Table 1). Interestingly, after extensive proteolysis, when the 30 kDa fragments were produced, the pore formation activity of the toxin was reduced to low levels (Table 1).

The toxicity of the midgut juice- and trypsin-digested Cry1Ab protoxins was tested using first instar *M. sexta* larvae. As shown in Table 2, the unprocessed protoxin had the highest activity. After longer times of protease treatment, when the 30 kDa fragments were observed, reduced toxicity was obtained.

Table 1
 K^+ permeability across *Manduca sexta* BBMVs induced by Cry1Ab activated toxin

Treatment	Protease/protoxin ratio ^a	$m_{\text{tox}} - m^b$
<i>M. sexta</i> midgut juice	1:1000	0.145
	1:100	0.059
	1:10	0.038
	1:1	0.010
Trypsin	1:100	0.028
	1:50	0.011
	1:20	0.006
	1:5	0.000

^a Cry1Ab protoxin was digested for 13 h with the indicated treatment. After digestion PMSF was added and samples were assayed for K^+ permeability.

^b The difference of the slope of the curve of each activated toxin (m_{tox}) minus the slope of the control trace in which the same amount of buffer was added (m_{in}) are presented. The slope (m) of the curves of changes in fluorescence (ΔF) (%) vs. K^+ equilibrium potential (E_{K^+}) (mV) or vs. external K^+ concentration was determined in BBMVs treated with 50 nM Cry1Ab (Fig. 5). Values are mean values of four different measurements. Standard deviations were less than 5%.

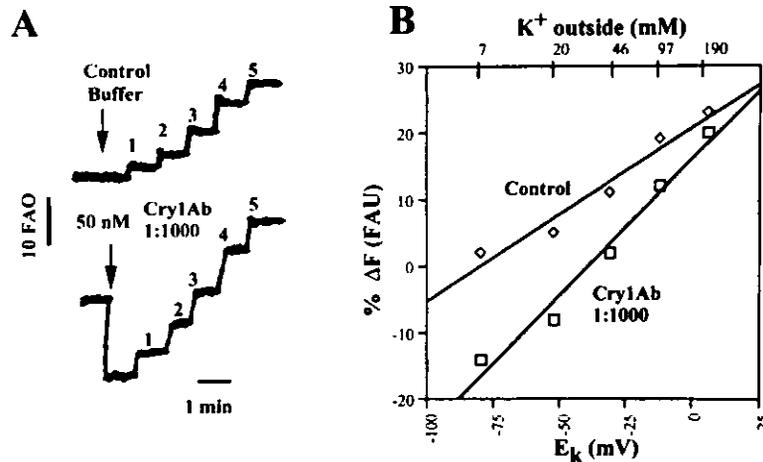


Fig. 5. K^+ permeability across *Manduca sexta* BBMVs induced by Cry1Ab-activated toxin. Changes in distribution of a fluorescent dye (Dis-C₁(5)) sensitive to changes in membrane potential were recorded as described in Section 2. Cry1Ab protoxin (50 nM) digested with 1:1000 midgut juice/protoxin ratio was added to BBMVs (20 μ g) loaded with 150 mM KCl, 2 mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 10 mM HEPES-HCl pH 7.5, and suspended in 150 mM MeGluCl, 10 mM HEPES-HCl pH 9 buffer. Pre-equilibration with 1.5 mM Dis-C₁(5) (2 min) is not shown. The arrow on top of the traces corresponds to the time of toxin addition. An upward deflection indicates a membrane potential depolarization, the opposite effect indicates an hyperpolarization. FAU=fluorescence arbitrary units. Final K^+ concentrations (mM) were: 1, 7; 2, 22; 3, 47; 4, 98; and 5, 195. In the control trace, buffer was added instead of toxin. (A) Fluorescence recording of K^+ permeability changes produced by the Cry1Ab toxin. (B) The slope (m) of the curve ΔF (%) vs. K^+ equilibrium potential (E_{K^+}) (mV) or vs. external K^+ concentration was determined. E_{K^+} was calculated using Nernst equation. Changes in fluorescence were determined four times.

Table 2
Toxicity of CryIAb-activated proteins to *Manduca sexta* larvae

Dose (ng/cm ²)	Mortality (%) ^a				
	Activation treatment and incubation time				
	Midgut juice		Trypsin		
		2 h	13 h	2 h	13 h
10	83	29	21	16	4
20	88	88	42	50	38
50	100	100	88	99	71

^a Mortality recorded in 24 first instar larvae and corrected for non-specific mortality observed in the control larvae that were not fed with toxin. Standard deviation was less than 5%.

4. Discussion

In vitro activation of CryIA protoxins is commonly achieved by commercial enzymes such as trypsin, usually at low concentration, producing the 60–70 kDa toxin fragment. However, it has been reported that other proteases such as subtilisin (Chestukhina et al., 1990; Pang et al., 1999), papain (Choma et al., 1990), chymotrypsin, thermolysin and pronase (Convents et al., 1991) produce smaller polypeptides in CryIA toxins, when used at high concentrations. Proteolytic processing within domain I has been reported for different Cry toxins. However, the biological significance of these cleavages is not clear since contradictory results have been reported. Cry2Aa and Cry3A toxins are cleaved between helices α 3 and α 4 by chymotrypsin. The processed Cry2Aa toxin did not retain the insecticidal activity (Audtho et al., 1999). In contrast, the activated Cry3A toxin increased its solubility over a wider pH range, and retained full activity against susceptible coleopteran larvae (Carroll et al., 1997). Cry4A, Cry9A and Cry4B were cleaved between helices α 5 and α 6 by midgut proteases of *Culex pipiens* for Cry4A and subtilisin for Cry9A and Cry4B. The processed proteins were toxic to susceptible larvae and the polypeptides remained associated in a complex (Yamagiwa et al., 1999; Zalunin et al., 1998). Komano et al. (1998) reported that in vitro processing of Cry4B by midgut proteases of *C. pipiens* produced inactive 18 and 46 kDa fragments. Cry9C was digested by trypsin after helix α 2b. This processing rendered the protein completely inactive (Lambert et al., 1996). In contrast, proteolytic cleavage of CryIAC by *Spodoptera litura* midgut proteases before helix α 2b has low effect in the toxicity against *Plutella xylostella* larvae (Ogiwara et al., 1992).

In this work, we demonstrated that in vitro and in vivo processing of CryIAb protoxin by *M. sexta* midgut juice proteases involved three intramolecular cleavages. The products of midgut juice treatment were different from

the products of the trypsin treatment. Extensive trypsin treatment with a 1:1 trypsin/protoxin ratio produced both 62 and 33 kDa proteins (Fig. 1B). In contrast, in vitro activation with midgut juice produced 60, 58 and two ~30 kDa fragments (Fig. 1B). The first cleavage produced by midgut proteases occurred at a 1:1000 protease/protoxin ratio and resulted in a 60 kDa toxin fragment. The N-terminal amino acid sequence of this fragment indicated that its formation was a result of a cleavage between residues Leu-57 and Gly-58 in the sequence LGLVDI located inside helix α 2a. The second proteolytic event was performed at a 1:100 protease/protoxin ratio producing a 58 kDa fragment. The N-terminal sequence of the 58 kDa fragment locates the cleavage site between residues Phe-67 and Gly-68 in the sequence FGPSQW between helices α 2a and α 2b. The highest in vitro pore formation activity was observed after the first intramolecular cleavage, and then decreased as further cleavages occurred (Fig. 5 and Table 1).

Finally, a third intramolecular cleavage produced two fragments of ~30 kDa, probably within domain II. One of the fragments has the N-terminal sequence of the second proteolytic event in the sequence FGPSQW as explained above. We could not obtain the N-terminal sequence of the third intramolecular cleaved fragment, because the sequence was blocked.

The in vitro pore formation activity was severely reduced when these two fragments were produced and in vivo toxicity was also decreased (Tables 1 and 2). We propose that this cleavage could be in domain II due to the size of the toxin. It has been reported that in vitro proteolysis by different proteases (chymotrypsin, thermolysin, subtilisin and pronase) cleaved CryIAB (Convents et al., 1991) and CryIAa (Pang et al., 1999) protoxins in the loop region connecting β 6– β 7 sheets of domain II, producing two fragments of a mass of 30 kDa. In the case of CryIAa toxin, this processing renders the protein inactive against *Bombyx mori* (Pang et al., 1999). These data suggest that cleavage within domain II of CryIA protoxin might be involved in toxin inactivation. The fact that the 30 kDa fragments were found after 15 min of in vivo digestion and that these fragments were still present after 4 h of ingestion (Fig. 2) suggested that these fragments were rather stable intermediates in the degradation pathway of the CryIAB toxin catalyzed by midgut proteases of *M. sexta*.

Similar N-terminal sequences to the first two cleavages reported here have been described for CryIAC toxin, produced by midgut juice of three different Lepidoptera insects. The first cleavage was found only by treatment of CryIAC protoxin with *Mamestra brassicae* midgut juice (Lightwood et al., 2000). The second cleavage was found by treatment with midgut juice from the three insects (*M. brassicae*, *Pieris brassicae* and *Spodoptera litura*) (Lightwood et al., 2000; Ogiwara et al.,

1992). The activation of CryIAc with *S. litura* midgut juice resulted in a slight reduction in toxicity against *P. xylostella* larvae. The activation with midgut juice from *M. brassicae*, which is a Lepidoptera-larva not susceptible to CryIAc, generates products of 58, 40 and 20 kDa that are insoluble (Lightwood et al., 2000).

We found that the midgut juice treatment produced a more active toxin for pore formation assays than the trypsin treatment (Table 1). The highest pore formation activity was obtained when helix $\alpha 1$ was cleaved. It is evident from Fig. 1B that the trypsin treatment did not produce the first two cleavages at the N-terminal of CryIAb, as was observed with *M. sexta* midgut juice. These data suggest that cleavages occurred inside helix $\alpha 2a$, and that cleavages between helices $\alpha 2a$ and $\alpha 2b$ might be produced by different proteases found in the midgut juice, or that insect trypsins may have different properties/specificity from their mammalian counterparts. We also conclude that helix $\alpha 1$ might be dispensable for membrane insertion and/or pore formation. These data agree with the previous report of Aronson et al. (1999), which showed that proteinase K treatment of CryIAc bound to BBMV from *M. sexta*, digested helix $\alpha 1$ while the rest of the toxin remained resistant to further proteolysis. Also, Ogiwara et al. (1992) reported that *P. xylostella* midgut proteases digested CryIAc between residues Leu-46 and Leu-47, located after helix $\alpha 1$, without decreasing the toxicity against *P. xylostella* larvae. Furthermore, the synthetic peptide of helix $\alpha 1$ was the only one out of the seven α -helices of domain I, which did not bind to the lipid membrane (Gazit et al., 1998).

The two 30 kDa fragments, obtained by midgut juice treatment, remained associated in solution (Fig. 3) possibly by non-covalent interactions, suggesting that this cleavage does not involve the loss of the globular structure of the protein. Similar results were obtained in the digestion of Cry3A and Cry4A protoxins with chymotrypsin, where the fragments also remained associated under non-denaturing conditions (Carroll et al., 1997; Yamagiwa et al., 1999). Also, in agreement with the finding that chymotrypsin-treated Cry3A bound to *L. decemlineata* BBMV (Carroll et al., 1997; Martínez-Ramírez and Real, 1996), we found that the 58 and 30 kDa fragments, obtained after midgut juice treatment of CryIAb toxin, bound to *M. sexta* BBMV (Fig. 4).

Proteolytic processing of Cry toxins is a critical step not only involved in protoxin activation, but also could be implicated in toxin specificity (Haider and Ellar, 1989; Haider et al., 1989) and insect resistance (Oppert et al., 1997; Shao et al., 1998). The lack of a major gut proteinase in *Plodia interpunctella* is responsible for its resistance to Cry toxins from *Bt* subspecies *entomocidus* HD198 (Oppert et al., 1997). On the other hand, it has been reported that rapid degradation of Cry toxins is associated with the loss of sensitivity of fifth instar *S.*

litoralis larvae to CryIC (Keller et al., 1996) and that serine protease inhibitors enhanced the insecticidal activity of some *Bt* toxins up to 20-fold (MacIntosh et al., 1990).

We found that the midgut juice of *S. frugiperda*, a CryIAb-tolerant lepidopteran, had a higher capacity to produce the 30 kDa fragments than the midgut juice from *M. sexta* (Fig. 1B). The midgut protease from this insect degraded CryIAb toxin at least five times faster than *M. sexta* (data not shown). Since *S. frugiperda* is not susceptible to CryIAb, our results support the hypothesis that the inactivation of *Bt* toxins by midgut proteases could be considered as a resistance mechanism. Therefore, it would be interesting to produce novel CryIAb toxins resistant to specific cleavages by midgut proteases which could enhance the potency of this biological insecticide.

Acknowledgements

We thank Dr Jorge Ibarra for supplying *M. sexta* eggs, Dr Edmundo Calva for the critical comments on the manuscript and Oswaldo López, Jorge Sánchez, Laura Lina and Javier Luévano for technical assistance. This research was supported in part by DGAPA/UNAM IN216300, IN206200, CONACyT 25248-N, 27637-N and EC-INCO ERB3514PL972673.

References

- Aranda, E., Sánchez, J., Peferoen, M., Gütereca, L., Bravo, A., 1996. Interaction of *Bacillus thuringiensis* crystal protein with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 68, 203–212.
- Arantes, O., Lereclus, D., 1991. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* 108, 115–119.
- Aronson, A.L., Geng, C., Wu, L., 1999. Aggregation of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins upon binding to target insect larval midgut vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2503–2507.
- Audtho, M., Valaitis, A.P., Alzate, O., Dean, D.H., 1999. Production of chymotrypsin-resistant *Bacillus thuringiensis* Cry2Aa1 δ -endotoxin by protein engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4601–4605.
- Bell, R.A., Joachim, F.G., 1976. Techniques for rearing laboratory colonies of tobacco budworms and pink bollworms. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 69, 365–373.
- Bravo, A., Jansens, S., Peferoen, M., 1992. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *J. Invertebr. Pathol.* 60, 237–247.
- Carroll, J., Convents, D., Van Damme, J., Boets, A., Van Rie, J., Ellar, D.J., 1997. Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A δ -endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. *J. Invertebr. Pathol.* 70, 41–49.
- Chestukhina, G.G., Tyurin, S.A., Kostina, L.I., Osterman, A.L., Zalunin, I.A., Khodova, O.A., Stepanov, V.M., 1990. Subdomain organization of *Bacillus thuringiensis* entomocidal proteins' N-terminal domains. *J. Protein Chem.* 9, 501–507.
- Choma, C.T., Surewicz, W.K., Carey, P.R., Pozsgay, M., Raynor, T., Kaplan, H., 1990. Unusual proteolysis of the protoxin and toxin

- from *Bacillus thuringiensis*. Structural implications. Eur. J. Biochem. 189, 523-527.
- Convents, D., Cherlet, M., Van Damme, J., Lasters, I., Lauwereys, M., 1991. Two structural domains as a general fold of the toxic fragment of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. Eur. J. Biochem. 195, 631-635.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Dean, D.H., 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 807-813.
- Dai, S.M., Gill, S.S., 1993. In vitro and in vivo proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryI_{VD} protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. Insect Biochem. Mol. Biol. 23, 273-283.
- García-Soto, J., González-Martínez, M., De La Torre, L., Darszon, A., 1988. Sea urchin sperm head plasma membranes: characteristics and egg jelly induced Ca²⁺ and Na⁺ uptake. Biochim. Biophys. Acta 944, 1-12.
- Gazit, E., LaRocca, P., Sansom, M.S., Shai, Y., 1998. The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95, 12289-12294.
- Güereca, L., Bravo, A., 1999. The oligomeric state of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in solution. Biochim. Biophys. Acta 1429, 342-350.
- Haider, M.Z., Ellar, D.J., 1989. Functional mapping of an entomocidal δ -endotoxin. Single amino acid changes produce by site directed mutagenesis influence toxicity and specificity of the protein. J. Mol. Biol. 208, 183-194.
- Haider, M.Z., Smith, G.P., Ellar, D.J., 1989. Delineation of the toxin coding fragments and an insect-specificity region of a dual toxicity *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. FEMS Microbiol. Lett. 49, 157-163.
- Harlow, E., Lane, D., 1988. Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 597pp.
- Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S., Van Houtven, A., Vanderbruggen, H., Vaeck, M., 1988. Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 54, 2010-2017.
- Keller, M., Sneh, B., Strizhov, N., Prudovsky, E., Regev, A., Koncz, C., Schell, J., Zilberstein, A., 1996. Digestion of δ -endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryI_C. Insect Biochem. Mol. Biol. 26, 365-373.
- Komano, T.M., Yamagiwa, T., Nishimoto, H., Yoshisue, H., Tanabe, K., Sen, K., Sakai, H., 1998. Activation process of the insecticidal proteins CryI_{VA} and CryI_{VB} produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Israel J. Entomol. 32, 185-198.
- Lambert, B., Buysse, L., Decock, C., Jansens, S., Piens, C., Saey, B., Seurinck, J., Van Audenhove, K., Van Rie, J., Van Vliet, A., Peferoen, M., 1996. A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. Appl. Environ. Microbiol. 62, 80-86.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M., Chauvaux, M., 1995. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* spoOA mutant. Biotechnology 13, 67-71.
- Lightwood, D.J., Ellar, D.J., Jarrett, P., 2000. Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* CryI_{AC} δ -endotoxin. Appl. Environ. Microbiol. 66, 5174-5181.
- Lorence, A., Darszon, A., Díaz, C., Liébano, A., Quintero, R., Bravo, A., 1995. δ -Endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. FEBS Lett. 360, 217-222.
- Lorence, A., Darszon, A., Bravo, A., 1997. The pore formation activity of *Bacillus thuringiensis* CryI_{AC} toxin on *Trichoplusia ni* membranes depends on the presence of aminopeptidase N. FEBS Lett. 414, 303-307.
- MacIntosh, S.C., Kishore, G.M., Perlak, F.J., Marrone, P.G., Stone, T.B., Sims, S.R., Fuchs, R.L., 1990. Potentiation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity by serine protease inhibitor. J. Agric. Food Chem. 38, 1145-1152.
- Martínez-Ramírez, A.C., Real, M.D., 1996. Proteolytic processing of *Bacillus thuringiensis* CryIIIA toxin and specific binding to brush border membrane vesicles of *Lepinotarsa decemlineata* (Colorado potato beetle). Pest. Biochem. Physiol. 54, 115-122.
- Ogiwara, K., Indrasith, L.S., Asano, S., Hori, H., 1992. Processing of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. J. Invertebr. Pathol. 60, 121-126.
- Oppert, B., Kramer, K.J., Beeman, R.W., Johnson, D., McGaughey, W.H., 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. J. Biol. Chem. 272, 23473-23476.
- Pang, A.S., Gringorten, J.L., Bai, C., 1999. Activation and fragmentation of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by high concentrations of proteolytic enzymes. Can. J. Microbiol. 45, 816-825.
- Rukmini, V., Reddy, C.Y., Venkateswerlu, G., 2000. *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. Biochimie 82, 109-116.
- 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.
- Shao, Z., Cui, Y., Liu, X., Yi, H., Ji, J., Yu, Z., 1998. Processing of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 in *Heliothis armigera* midgut juice and the effects of protease inhibitors. J. Invertebr. Pathol. 72, 73-81.
- Thomas, W.E., Ellar, D.J., 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal δ -endotoxin: effect in insect and mammalian cells in vitro. J. Cell Sci. 60, 181-197.
- Wolfersberger, M., Lüthy, P., Maurer, A., Parenti, F., Sacchi, V., Giordana, B., Hanozet, G.M., 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). Comp. Biochem. Physiol. 86A, 301-308.
- Yamagiwa, M., Esaki, M., Otake, K., Inagaki, M., Komano, T., Amachi, T., Sakai, H., 1999. Activation process of dipteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3464-3469.
- Zalunin, I.A., Revina, L.P., Kostina, L.I., Chestukhina, G.G., Stepanov, V.M., 1998. Limited proteolysis of *Bacillus thuringiensis* CryI_G and CryI_{VB} δ -endotoxins leads to formation of active fragments that do not coincide with the structural domains. J. Protein Chem. 17, 463-471.