



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Caracterización de Mutantes en el Dominio II de la Toxina Insecticida Cry I Ca de Bacillus thuringiensis”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JUAN CONDE GUZMAN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ALEJANDRA BRAVO DE LA PARRA





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

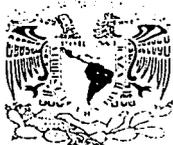
“Caracterización de Mutantes en el Dominio II de la Toxina Insecticida Cry1Ca de *Bacillus thuringiensis*”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JUAN CONDE GUZMAN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ALEJANDRA BRAVO DE LA PARRA





la Dirección General de Bibliotecas
a difundir en formato electrónico e impr
veniendo de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Juan Conde
Guzmán
FECHA: 12-NOV-2002
Lugar

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
"Caracterización de Mutantes en el Dominio II de la Toxina Insecticida CryIc_a de
Bacillus thuringiensis".

realizado por Juan Conde Guzman

con número de cuenta 9854342-1 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario	Dra. Alejandra Bravo de la Parra
Propietario	Dr. Enrique Rudiño Pinera
Propietario	Dr. Jaun Miranda Rios
Suplente	Dr. José Luis Puente Garcia
Suplente	Dr. Carlos Federico Arias Ortiz

Alejandra Bravo de la Parra

Enrique Rudiño Pinera

Juan Miranda Rios

José Luis Puente Garcia

Carlos F. Arias O.

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Juan Manuel Rodríguez Chávez
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

El presente trabajo fue realizado en el departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Alejandra Bravo de la Parra. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), proyecto Z-001 y ayuda económica de alimentación y hospedaje otorgada por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para Daniel Castillo.

A la memoria de Ing. Ana Perellón Mancebo.

AGRADEZCO

A la Dra. Alejandra Bravo de la Parra por permitirme ser parte de su grupo de investigación. Por su dirección y apoyo en el desarrollo de mi formación académica.

A los sinodales (Dr. Enrique Rudiño, Dr. Juan Miranda, Dr. Carlos F. Arias y Dr. José Luis Puente) por aceptar revisar el trabajo escrito y sus valiosas aportaciones.

Al Dr. Carlos Muñoz por sus atinados consejos y su paciencia infinita.

Al Dr. Eduardo Horjales y particularmente al Dr. Enrique Rudiño por la elaboración del modelo teórico de la toxina Cry1Ca.

Al Dr. Mario Soberón por revisar la tesis escrita.

A la Dra. Ma. Dolores Real y Dra. Carolina Rausell por su ayuda en el marcaje de la toxina, por su hospitalidad invaluable.

A los compañeros de laboratorio: Dra. Isabel Gómez, Dr. Carlos Muñoz, Dr. Raúl Miranda, Biól. Jorge Sánchez, Oswaldo López, M. En C. María Tabche, M. En C. Guadalupe Peña, Biól. Lizbeth Cabrera, Claudia P., Itzel B., Ivan A., Giovanni., Claudia M., Graciela D. y Margarito por su amistad y su valiosa ayuda en la realización de este trabajo.

A mis amigos: Karla, Iris, Orestes y Tzindilu por su amistad a lo largo de la carrera. Juntos seguiremos siendo el super equipo de siempre.

A Miguel Berzosa, Enrique Benavidez y a todos los compañeros del Colegio Mayor, por su hospitalidad infinita y su amistad sin medida.

A Georgina Hernandez y Mauricio Realpe por las fructíferas discusiones académicas y consejos técnicos. Por su valiosa amistad.

A mis padres por su apoyo moral desde siempre. Especialmente a mi madre por todo su amor y comprensión. Gracias "Jose".

A mi hermanas Azucena y Sara por su confianza y apoyo.

CONTENIDO

1. Introducción.	1
1.1 Estructura de las proteínas Cry.	4
1.2 Bloques conservados.	5
1.3 Mecanismo de acción de las proteínas Cry.	7
1.4 Tipos de receptores.	11
1.5 Sitios de unión de la toxinas Cry a su receptor:	12
1.5.1 Dominio II.	12
1.5.2 Dominio III.	13
2. Antecedentes.	15
Objetivo	
Hipótesis	
3. Materiales y métodos.	18
3.1 Cultivo de la bacteria.	
3.2 Bioensayos de toxicidad en larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> y <i>Aedes aegypti</i> .	18
3.3 Determinación de concentración de proteína (método de Bradford).	18
3.4 Purificación de cristales por gradiente discontinuo de sacarosa.	19
3.5 Solubilización de cristales (obtención de protoxina).	19
3.6 Corte con tripsina (obtención de toxina).	20
3.7 Ensayo de estabilidad estructural mediante resistencia a degradación proteolítica.	20
3.8 Marcaje de toxina con biotina.	20
3.9 Preparación de vesículas de la microvellosidad apical (VMVA) de células de intestino medio de <i>Spodoptera frugiperda</i> .	22
3.10 Ensayo de unión de toxina biotinada a VMVA.	22
3.11 Ensayo de competencia homóloga.	23
3.12 Determinación de secuencia de aminoácidos del dominio II de toxinas mutantes.	23
3.13 Modelo teórico de la estructura de la toxina Cry1Ca.	24
3.14 Células competentes.	25
3.15 Transformación de <i>Escherichia coli</i> .	26
3.16 PCR mutagénico.	26
3.17 Marcaje radiactivo de la toxina Cry1Ca.	27
4. Resultados.	29
4.1 Bioensayos de toxicidad en larvas de insectos susceptibles.	29
4.2 Solubilización de cristales.	32
4.3 Procesamiento de protoxina.	32
4.4 Localización de mutantes.	35
4.5 Modelo teórico de la toxina Cry1Ca.	36
4.6 Marcaje de toxina con biotina.	39

4.7	Ensayo de unión de toxina biotinada a VMVA.	40
4.8	Competencia homóloga.	42
4.9	Marcaje radiactivo de la toxina Cry1Ca.	42
5.	Discusión.	46
6.	Perspectivas.	52
6.1	Análisis de unión.	52
6.1a	“Surface Plasmon Resonance”.	52
6.2	Elaboración de mutantes puntuales.	52
6.3	Mutagenesis aleatoria del dominio III de la toxina Cry1Ca.	53

Literatura citada.

1. Introducción.

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram-positiva, aerobia, la cual se encuentra ampliamente distribuida en el mundo en una gran diversidad de microambientes como son: suelo, insectos, polvo, follaje, etc.

Dentro de las bacterias Gram-positivas las del género *Bacillus* se caracterizan por su formación de endosporas; este género se divide en varios grupos con base en la morfología de la endospora y el esporangio. Un grupo comprende a las bacterias: *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. anthracis* y *B. mycoides*, las cuales presentan una forma celular ovalada y esporas elipsoides o cilíndricas. Hay cierta controversia en cuanto a considerar a *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides* como variedades de *B. cereus* o como especies independientes, ya que estas bacterias difieren de *B. cereus* en pocas características: *B. anthracis* y *B. cereus* son patógenos de mamíferos, *B. thuringiensis* es un patógeno de insectos y *B. mycoides* presenta un crecimiento rozoidal (Damgaard, P. H., 1996). Estas bacterias presentan dos fases de crecimiento durante su ciclo de vida: una fase de crecimiento vegetativo en la cual la bacteria se duplica por bipartición y una fase estacionaria en la cual se inicia un proceso de esporulación como respuesta al estrés nutricional del medio. Durante la esporulación la bacteria se divide asimétricamente en dos compartimentos: la célula madre y el compartimento de la espора, el cristal proteico se acumula en la célula madre.

La gran importancia de Bt es que una vez que entra en el proceso de esporulación, la bacteria comienza una alta producción de proteínas dentro de la célula madre, las cuales tienen actividad insecticida. Estas proteínas se acumulan en forma de una inclusión cristalina; esto es, un cristal parasporal que contiene las toxinas conocidas con el nombre de δ - endotoxinas o proteínas Cry (cristal) además de proteínas Cyt (Citólisis). Este cristal protéico constituye aproximadamente el 20- 30% del peso seco de la bacteria (Fig. 1).



Fig.1. Fotografía electrónica del cristal Proteico (Cry3A) producido por la cepa silvestre EG1661 (Baum, J. A., y Malvar, T., 1995) C = cristal romboide, S = espора.

Originalmente Bt se aisló del gusano de seda en 1901 y se pensó que era un patógeno de lepidópteros. Posteriormente se encontraron variedades con actividad insecticida hacia coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros; así como nemátodos y protozoarios. También

se ha encontrado que Bt produce ciertos compuestos antibióticos con actividad fungicida (Bravo, A. y Soberón, M., 2000). Además de las δ - endotoxinas ya mencionadas Bt cuenta con otros factores de virulencia (Tabla 1) y proteínas VIP (vegetative insecticidal proteins). Las proteínas VIP también matan insectos en semejanza a las δ - endotoxinas, pero a diferencia de estas las VIP se producen y secretan al medio durante la fase vegetativa del crecimiento y no forman cristal (Estruch, *et al.*, 1992).

Tabla 1
Factores de virulencia en *B. thuringiensis*.

Factor de virulencia	Peso molecular	Efecto	Referencia
Fosfolipasa C	34kDa	Hidroliza membranas fosfolipídicas.	Titbal R.W., 1993. en Damgaard, 1996.
Hemolisina II	≈ 47kDa	Actúa sobre células de mamífero	Budarina Z.I <i>et al</i> 1994. en Damgaard, 1996.
Quitinasas	45-80kDa	Hidroliza quitina rompiendo enlaces α 1-4 glucosídicos	Kramer J.M 1997. Samson, M.S 1998. en Damgaard, 1996.
Turicinas	11. 6 kDa	Tiene actividad de bacteriocinas contra otras especies de <i>Bacillus</i> .	Favret M.E. <i>et al.</i> 1989; Cherif A. et al. 2001 en Damgaard, 1996.
Beta- exotoxinas	Moléculas análogas al ATP.	Actúan como inhibidores de la RNA polimerasa.	Kim, Y.T. <i>et al</i> 1970. en Damgaard, 1996.

Tabla1. Factores de virulencia conocidos en *B. thuringiensis*. en Damgaard, P. H., 1996.

El proceso de esporulación ha sido bien estudiado y se sabe que consta de siete estadios (I - VII), el primero de los cuales puede ser revertido si se adicionan nutrimentos al medio de cultivo. Después del segundo estadio el proceso de esporulación es irreversible. Durante el crecimiento vegetativo tenemos un crecimiento exponencial y el factor sigma responsable de la transcripción génica es σ^A (Bravo, A. y Soberón, M., 2000).

En el primer estadio (I) se tiene la inducción de los genes de la esporulación así como el factor sigma específico del estado de transición: σ^H ; dando lugar, en el estadio II a la formación de un septo asimétrico el cual divide a la bacteria en célula madre, donde se formará el cristal protéico y el compartimento donde se formará la espora.

En el estadio III inicia la formación del cristal. Durante este estadio se activan los factores σ^E y σ^F en los compartimentos de la célula madre y el de la espora, respectivamente. Durante el estadio III, así como en el estadio IV, actúa un promotor (Bt1) el cual es activado por σ^E . Durante el estadio V se inducen y activan los factores σ^K y σ^G en los compartimentos de la célula madre y la espora, respectivamente. En este estadio, así como en el estadio VI, continúa la síntesis de proteínas Cry y aquí actúa un segundo promotor, Bt2, el cual es activado por el factor σ^K . En el último estadio (VII) se producen enzimas líticas que liberan a las esporas y los cristales insecticidas (Bravo, A. y Soberón, M., 2000).

En la fig. 2 se muestra un esquema del control genético de la esporulación y la producción de toxinas insecticidas durante el ciclo de vida de *B. thuringiensis*, así como la aparición de los diferentes factores sigma en el tiempo.

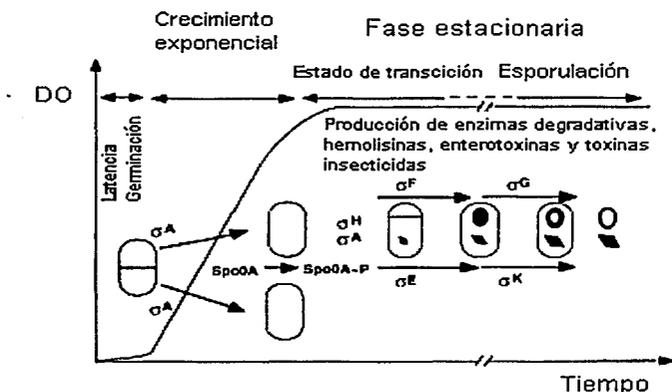


Fig. 2. Control genético de la esporulación y la producción de toxinas en *B. thuringiensis*. Adaptada de Lereclus *et al.*, 2000.

¿Pero cómo es que Bt produce tanta proteína Cry? Los genes de las proteínas Cry se encuentran codificados en plásmidos de bajo número de copias (Baum y Malvar, 1995). Se sugiere que la alta producción de proteína Cry se debe a la alta estabilidad del mRNA. Se ha reportado que los mRNAs codificantes de proteínas Cry presentan una vida media de 10 minutos a diferencia de los mRNAs de otros genes que tienen una vida media de 1-2 minutos. Los elementos en *cis* que confieren estabilidad a estos se clasifican de acuerdo a su localización en el gen como estructuras terminales 3' y estabilizadores de mRNA en 5' (Agaisse y Lereclus, 1995). También se propone que la presencia de dos promotores ayudaría a la alta producción de proteína debido a su activación secuencial (Agaisse, H. y Lereclus, D., 1995), aunque no se han reportado estudios genéticos al respecto.

Por último, el cristal mismo es una excelente forma de obtener grandes cantidades de proteína resistente a la acción de proteasas a la vez que son solubles en el intestino del insecto blanco. Estas dos características, estructura y solubilidad, al parecer dependen de factores como la estructura secundaria, la presencia de puentes disulfuro, así como de componentes adicionales (proteínas auxiliares: P19 y P20 en la toxina Cry4D, ORF1 y ORF2 en la toxina Cry2A), las cuales estarían involucradas en la cristalización de las proteínas Cry (Agaisse, H. y Lereclus, D. 1995; Baum, J. y Malvar, T. 1995).

1.1. Estructura de las proteínas Cry.

Actualmente se conoce la estructura tridimensional de tres proteínas Cry: Cry1Aa, Cry3A y Cry2A (Fig. 3). Las proteínas Cry en general están constituidas por tres dominios globulares (I, II, III), cada uno de los cuales tiene un papel específico durante la actividad tóxica de la proteína.

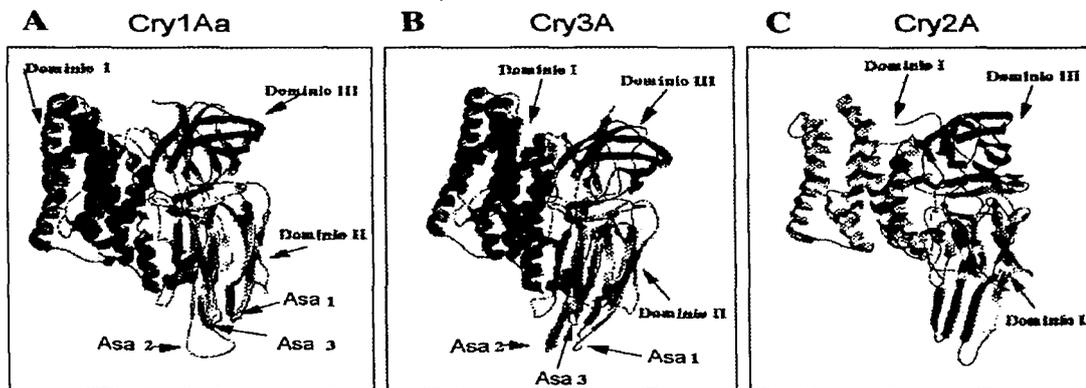


Fig. 3. Representación esquemática de las proteínas Cry1Aa, Cry3A y Cry2A. Adaptada de Bravo y Soberón, 2000.

El dominio I consiste de un ramillete de 7 α -hélices, de los cuales la hélice α -5 se encuentra rodeada por el resto de las α -hélices; se asume que este dominio actúa en la inserción en membrana y formación del canal iónico o poro (Grochulsky, *et al.*, 1995; Carroll y Ellar, 1991).

El dominio II está formado por tres láminas β - plegadas antiparalelas las cuales terminan en asas (asas 1, 2 y 3); este dominio está involucrado en la especificidad hacia el insecto susceptible y en el reconocimiento de moléculas receptoras sobre las células de la membrana apical del intestino del insecto (Grochulsky, *et al.*, 1995; Carroll y Ellar, 1991). Principalmente las tres asas se han descrito como los sitios más importantes en la interacción con el receptor mediante experimentos de mutagénesis sitio dirigida (Smith y Ellar, 1994; Abdul-Rauf y Ellar, 1999).

El dominio III consiste de dos láminas beta antiparalelas formando un " β - sandwich". Se sugiere que el dominio III mantiene la estructura general de la proteína y que pudiera estar involucrado en la formación del canal iónico (ya que parte de este dominio está en contacto con el dominio I (Pietrantonio y Gill, 1996; Carroll y Ellar, 1991). Mediante cristalografía de rayos X de la toxina Cry1Ac con su ligando N-acetil-D-galactosamina (GalNac) presente en el receptor amino peptidasa N (APN) se ha demostrado que el azúcar GalNac se une al dominio III de dicha toxina (Derbyshire, *et al.*, 2001).

1.2. Bloques conservados.

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Cry muestra que existen cinco secuencias de aminoácidos o bloques conservados, los cuales se encuentran distribuidos en las regiones de contacto entre dominios, así como en las regiones internas del dominio I y III (Fig. 4).

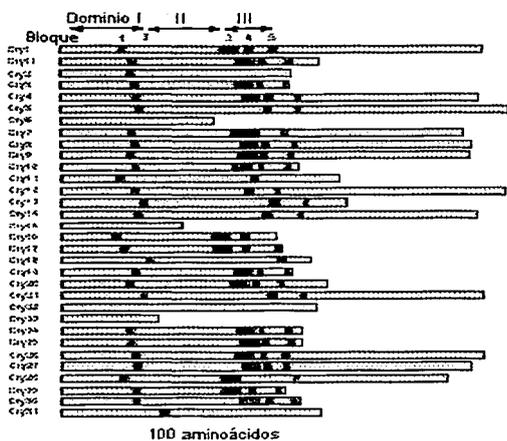


Fig. 4. Se muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Cry donde se observa la posición de los bloques conservados, aquellas secuencias que no presentan los bloques son toxinas con actividad insecticida reportada que no presentan estas secuencias canónicas (de Maagd *et al.*, 2001).

En un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las toxinas Cry podemos observar que dentro del grupo de toxinas que presentan los bloques conservados el tamaño en las diferentes protoxinas es variable (Fig. 4) encontrándose que el tamaño puede ser de alrededor de 130 kDa o de alrededor de 70 kDa, sin embargo todas ellas al ser procesadas por las enzimas digestivas del insecto se convierten en toxinas de alrededor de 60 kDa. Es importante notar que existen secuencias de proteína con actividad insecticida reportadas que no presentan ningún bloque conservado, además de que presentan un tamaño diferente (Schnepf *et al.*, 1998), lo cual sugiere que estas proteínas podrían tener una estructura y mecanismo de acción diferente al resto de las toxinas Cry.

Se ha determinado la secuencia consenso de aminoácidos para cada bloque conservado dentro de las δ - endotoxinas (Tabla 2), así como la posición que ocupan dentro de la estructura de las toxinas Cry (Fig. 5).

Tabla 2.
Bloques conservados en las toxinas Cry.

Bloque	Consenso	Localización
1	LPVYAQAANLHLXLLRD	Dominio I
2	WVRYNQFRREMTLXLVDLVALFPXY DXRXYP	Unión dominio I y II
3	WTHRSADXXNTIXXXITQIPLVKAXXLXXGXVXVXGPGFYGGDIL	Unión dominio II y III
4	QRYRVRIRYAS	Dominio III
5	VYIDRIEFPV	Dominio III

Tabla 2. Se muestra la secuencia consenso, así como la localización de cada uno de los bloques conservados (Charles *et al.*, 2000).

En la fig. 5 observamos la localización espacial de los bloques conservados utilizando como modelo a la toxina Cry1Aa.

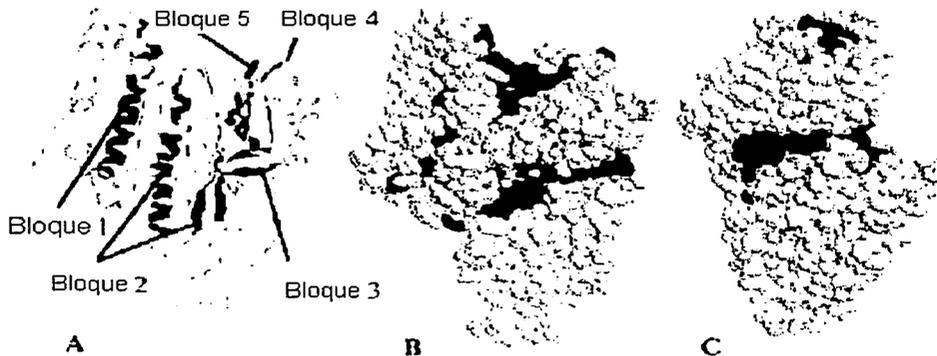


Fig.5. Visualización de bloques conservados en la estructura tridimensional de la toxina Cry1Aa. A) Modelo de listones. B y C) Modelo CPK. C es una rotación de 90° de B. Imagen adaptada de Yamamoto y Dean., 2000.

El bloque 1 lo constituye la hélice α -5 del dominio I, la cual se cree está involucrada en la formación del poro o canal iónico, lo cual explicaría su naturaleza conservada. Incluso podría estar involucrada en mantener cierta integridad estructural del haz o ramillete de α -hélices dada su localización central en este dominio (Schnepf *et al.*, 1998).

El bloque 2 lo forma la hélice α -7 en el dominio I y la primera lámina beta del dominio II; este bloque constituye la región de unión del dominio I y II. Se ha demostrado que esta región debe presentar una cierta flexibilidad entre el dominio I y II de la toxina Cry1Aa, pues restringiendo el movimiento mediante puentes disulfuro se pierde la actividad de formación de poro (Schwartz *et al.*, 1997).

Los bloques 3, 4 y 5 se localizan en el dominio III; el bloque 3 contiene la última lámina beta del dominio II la cual forma una estructura involucrada en la

interacción del dominio I y III. Los bloques 4 y 5 corresponden a las hojas beta centrales del dominio III (Schnepf *et al.*, 1998). En el bloque 4 se encuentran cuatro argininas las cuales establecen puentes salinos intramoleculares con residuos ácidos del bloque 5.

Además, en un estudio en el cual se comparan las secuencias de la mitad carboxilo terminal del fragmento de la protoxina, se sugiere la presencia de tres bloques adicionales (bloques 6, 7, y 8) los cuales se encuentran fuera del centro activo de la proteína (Schnepf *et al.*, 1998).

Al parecer las mitades carboxilo terminal permiten a las protoxinas con un peso característico de 130- 140 kDa (según la metodología de varios autores) agregarse en el cristal, quizá debido a la formación de puentes disulfuro intermoleculares, permitiendo a las proteínas formar un solo cristal en la célula madre durante la esporulación (Baum y Malvar, 1995).

1.3 Mecanismo de acción de las proteínas Cry.

Antes de detallar el mecanismo de acción de las toxinas Cry cabe mencionar los síntomas que se presentan en los insectos susceptibles una vez que ingieren los cristales proteicos. En primer lugar hay un cese de la ingesta, vómito, diarrea, parálisis total y por último la muerte, además la larva adquiere un color negro característico de la infección por Bt. (Bravo, A. y Soberón, M., 2000; Lorence, 1997b).

El mecanismo de acción de las proteínas Cry comprende una serie de eventos moleculares después de que el insecto susceptible ingiere a los cristales (Fig.6).

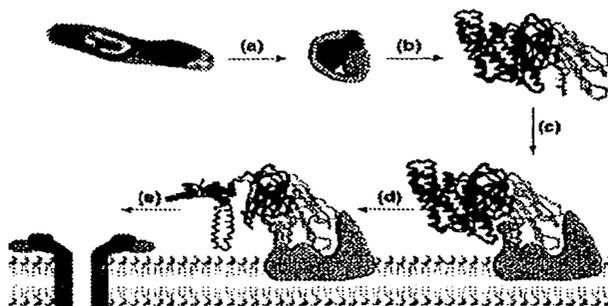


Fig.6 Mecanismo de acción de las toxinas Cry. Tomada de de Maagd *et al.*, 2001.

- a).- Solubilización del cristal proteico dentro del intestino del insecto.
- b).- Procesamiento proteolítico de la protoxina llevada a cabo por las proteasas del intestino del insecto.
- c).- Unión de la toxina activa al receptor.
- d).- Cambio conformacional de la toxina.
- e).- Formación del canal iónico y lisis de las células epiteliales del intestino (Lorence *et al.*, 1995; Schnepf *et al.*, 1998; Rajamohan *et al.*, 1998).

El cristal está compuesto de protoxinas y éste se solubiliza a pH alcalino y ambiente reductor dentro del intestino del insecto; una vez que el cristal es solubilizado las protoxinas son procesadas o activadas por proteasas propias del insecto; dentro de las proteasas en lepidópteros tenemos que son del tipo de las serín- proteasa como la tripsina y la quimiotripsina, aunque también existen otro tipo de proteasas como cisteín- proteasas y metalo- proteasas, principalmente. Por ejemplo, la protoxina Cry1A tiene un peso de 130-135 kDa; después del procesamiento presenta un tamaño de 55 a 65 kDa (Rajamohan *et al.*, 1998). Se ha demostrado que cierto decremento en la solubilidad de estos cristales influye en la toxicidad de las toxinas y que esto podría ser un mecanismo de resistencia por parte de los insectos.

Una vez que la toxina ha sido procesada el fragmento tóxico resistente a proteólisis se une a su receptor. Mediante experimentos histopatológicos se ha determinado que las toxinas actúan sobre la microvellosidad apical de las células del intestino en los insectos (fig. 7).

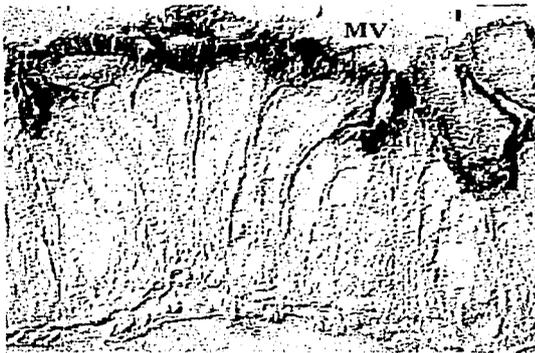


Fig. 7. Toxina unida a la microvellosidad apical de intestino del insecto (MV). Imagen tomada de Bravo, A. y Soberón, M., 2000.

La unión de las toxinas a receptores extracelulares presentes en la microvellosidad apical de las células del intestino del insecto se lleva a cabo por los residuos específicos del dominio II, así como del dominio III. Este ha sido uno de los eventos más estudiados dentro del mecanismo de acción. La utilización de sistemas tales como la elaboración de vesículas de membrana de la microvellosidad apical (Wolfersberger *et al.*, 1987), resonancia de superficie (surface plasmon resonance), mutaciones sitio-dirigidas en dominio II y III (Dean *et al.*, 1996), toxinas marcadas radiactivamente y estudios de fluorescencia, han permitido tanto la caracterización de posibles receptores de membrana, así como de regiones de la proteína que interactúan con estos receptores. Se ha demostrado que las proteínas receptoras de las toxinas Cry1A en insectos son aminopeptidasas y caderinas (Vladamudi, *et al.*, 1995; Nagamatsu *et al.*, 1999).

Mediante estudios de competencia homóloga se ha demostrado que la cinética de unión de las δ - endotoxinas es bifásica. Constituyendo una primera unión reversible, donde hay una interacción inicial entre la toxina y el receptor, y posteriormente una unión irreversible donde se presenta una inserción de la toxina

en las células de la microvellosidad apical de intestino del insecto (Aronson y Shai, 2001).

Una vez que se da la unión al receptor se induce un cambio conformacional en la toxina, el cual incluso sería facilitado por la acción proteolítica de las proteasas del insecto. Se propone que una vez que la toxina interacciona con el receptor tipo caderina se produce un cambio conformacional que permite el corte de la hélice α -1 exponiendo residuos hidrofóbicos que favorecen la oligomerización de las toxinas para formar el canal iónico (Pietrantonio y Gill, 1996; Aronson et al., 1999; Gómez *et al.*, 2002). Incluso se ha demostrado que en el procesamiento *in vitro* de la toxina Cry1Ab con las proteasas del intestino medio de *Manduca sexta* también se produce un corte que remueve la hélice α -1 y que este corte no interfiere con a) la unión de la toxina a vesículas de la microvellosidad apical de *M. sexta*, b) la actividad tóxica ni con c) la capacidad de formación de poro de la toxina; la cual incluso es mayor cuando se pierde la hélice α 1 (Miranda *et al.*, 2001). Así mismo, un corte posterior en el dominio II produce dos fragmentos de 30 kDa y la toxina pierde toda actividad tóxica. Se concluye que el primer corte de la hélice α -1 es parte del proceso de activación de la toxina, mientras que cortes posteriores en la estructura de la toxina están relacionados con el proceso de degradación e inactivación de la toxina Cry1Ab (Miranda *et al.*, 2001). Además, se ha demostrado en una toxina mutante de Cry1Ac, que si se evita el corte que remueve el extremo amino terminal se pierde completamente la capacidad de formación de poro en VMVA de *M. sexta* (Bravo *et al.*, 2002).

Se propone que una vez que la protoxina se procesa adecuadamente es capaz de interactuar con otros monómeros para formar un oligómero e insertarse en la membrana. Para demostrar que esta interacción se lleva a cabo se realizó un experimento en el laboratorio utilizando dos monómeros afectados dentro del mecanismo de acción, la toxina mutante Cry1Ab F371A, afectada en la unión a receptor y la toxina mutante Cry1Ab H168F afectada en formación de poro, las cuales al probarse por separado no presentaban toxicidad. Se demostró que debe haber una interacción de los monómeros antes de insertarse en la membrana, ya que al agregar concentraciones iguales de ambas toxinas se recuperaba la actividad de formación de poro y por tanto de toxicidad hacia larvas de *M. sexta* (Soberón *et al.*, 2000). La formación del poro es el paso menos estudiado en el mecanismo de acción.

En un experimento llevado a cabo por Schwartz *et al.* (1997) se demuestra mediante la restricción de movimientos intramoleculares por producción de puentes disulfuro en la toxina Cry1Aa que debe haber cierta flexibilidad en la región que une al dominio I y II para la correcta formación del poro, ya que la restricción de movimiento entre estos dominios impide la formación del poro. En este trabajo se propone que inserción en la membrana del asa conformada por las hélices α -4 y α -5 del dominio I tiene un papel importante en la formación y función del poro. También se especula que la formación del canal iónico requiere la

agregación de cuatro moléculas de toxina, donde las hélices α -4 del dominio I constituyen el lumen del canal iónico.

Hasta el momento se desconoce la estructura de la toxina cuando se inserta en la membrana; sin embargo, de acuerdo a las evidencias experimentales y haciendo analogía con otras toxinas, se han propuesto dos modelos (Fig. 8).

- a) Modelo del abrecartas.
- b) Modelo del paraguas.

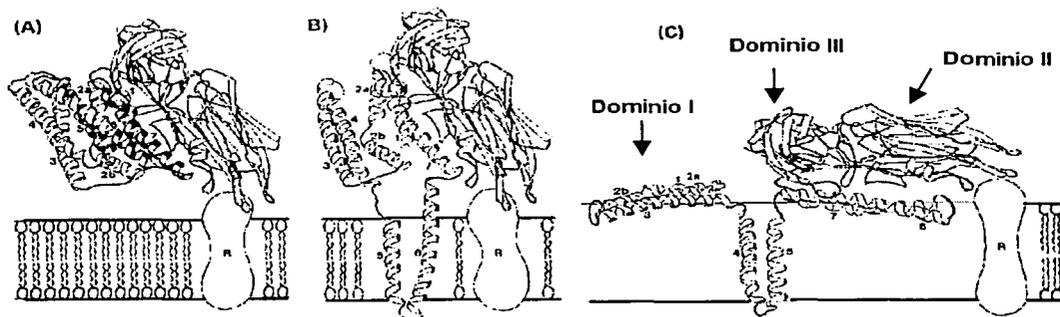


Fig. 8. Representación esquemática del cambio conformacional de la toxina al insertarse en la membrana. A) Interacción de la toxina con su receptor. B) Inserción de las hélices α -5 y α -6 en el modelo del abrecartas. C) Inserción de las hélices α -4 y α -5 en el modelo del paraguas. R: receptor. Imagen adaptada de Bravo, A. y Soberón, M., 2000.

En el modelo del abrecartas (fig.8B) se propone que las hélices α -5 y α -6 se insertan en la membrana a consecuencia de un cambio conformacional inducido por el receptor; este modelo no contempla la participación del resto de la proteína.

En cuanto al modelo del paraguas (Gazit *et al.*, 1998), el cual ha sido objeto de recientes revisiones y demostraciones (fig.8C), se plantea que:

- a) El dominio I se separa/ aleja del resto de la toxina.
- b) El extremo carboxilo de la hélice α -4 y el extremo amino de la hélice α -5 se introducen en la membrana en forma de una asa, mientras que el resto de las hélices se aplanan sobre la superficie de la membrana.
- c) Se propone que se requiere la agregación de 4 moléculas de toxina para la formación del canal iónico, donde las caras hidrofóbicas de las hélices α -4 forman el lumen del poro.
- d) Las hélices α están alineadas de tal forma que las cadenas laterales de los aminoácidos cargados negativamente (Glu₁₂₉ y Asp₁₃₆) se posicionan dentro del lumen del canal iónico, formando dos anillos concéntricos de cargas negativas (Bravo, A. y Soberón, M., 2000; Masson *et al.*, 1999; Gazit *et al.*, 1998).

1.4 Tipos de receptores.

Se ha demostrado que la mayoría de las toxinas Cry1 se unen con alta afinidad a glicoproteínas cuyos pesos moleculares varían entre 63 y 220 kDa. Se sabe que las proteínas de unión para las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac en *M. sexta*, *Heliothis virescens*, *Lymantria dispar*, *Plutella xylostella*, *Bombix mori* son miembros de la familia de las aminopeptidasas de tipo N, con peso molecular cercano a 120 kDa.

También se ha demostrado que la aminopeptidasa N (APN) está unida a la membrana mediante un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI); esta ancla de GPI es susceptible a la acción de la enzima fosfolipasa C, la cual al cortar el ancla de GPI procesa a la APN en una forma soluble de 115 kDa. La APN en forma soluble mantiene la capacidad de unirse a la toxina de forma específica (Bravo, A. y Soberón, M., 2000; Lorence, 1997a).

Por otra parte, se ha observado que el azúcar N-acetil-D-galactosamina (NAcGal) inhibe de manera específica la unión entre la APN y la toxina Cry1Ac en *M. sexta*, *H. virescens*, *L. dispar* y *P. xylostella*; lo cual sugiere que la proteína de unión de Cry1Ac es un glicoconjugado que contiene NAcGal y que este azúcar participa en la interacción entre la APN y la toxina Cry1Ac (Bravo, A. y Soberón, M., 2000; Burton *et al.*, 1999; Derbyshire *et al.*, 2001). También se ha demostrado que la capacidad en la formación de poro de la proteína Cry1Ac depende de la cantidad de APN presente en VMMA de larvas de *Trichoplusia ni*, no de la capacidad enzimática de la APN (Lorence *et al.*, 1997a).

En otro experimento llevado a cabo por Martínez-Ramírez *et al.* (1994) se reportó la unión de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac a un receptor de 210 kDa en VMMA de *M. sexta*. Este receptor resultó ser una nueva proteína glicosilada del tipo de las caderinas (Vladamudi *et al.*, 1995); por tanto, se cree que este receptor contiene sitios de unión comunes para las proteínas Cry1Aa, b y c.

Aranda *et al.* (1996) reportan mediante ensayos de unión de ligando que la toxina Cry1Ca se une a dos proteínas presentes en la microvellosidad apical de células de intestino de *S. frugiperda* con un tamaño de 40 y 44 kDa, respectivamente; mientras que la toxina Cry1Ab se une a una proteína de 150 kDa en las mismas vesículas. Incluso en ensayos de unión de ligando realizados por Sanchis y Ellar (1993) se demuestra que la toxina Cry1Ca también se une a una proteína de 40 kDa presente en las vesículas de microvellosidad apical de intestinos de *S. littoralis* y que la toxina Cry1Ac reconoce a una proteína de un peso similar además de unirse a otra proteína con un peso de 120 kDa. Se ha reportado que la toxina Cry1Ca reconoce a una proteína de 106 kDa, con actividad de aminopeptidasa, presente en vesículas de microvellosidad apical de intestino de *M. sexta* (Luo *et al.*, 1996).

El papel de caderina como receptor de la toxina Cry1Aa, la cual es tóxica hacia *Bombix mori*, se ha demostrado expresando al gen que codifica para la caderina

de *B. mori* en una línea celular de *S. frugiperda* (Sf9), contra la cual dicha toxina no presenta toxicidad. Al expresar el receptor en esta línea celular, mediante un baculovirus, las células se vuelven susceptibles a la toxina Cry1Aa, provocando que las células se hinchen y se lisen (Nagamatsu *et al.*, 1999).

1.5 Sitios de unión de las toxinas Cry a su receptor.

1.5.1 Dominio II

Dentro del dominio II los sitios de interacción son las asas en la parte apical de este dominio. El asa de la hélice $\alpha 8$, localizada entre la hélice α -8 y lámina $\beta 1$ en la proteína Cry3A o localizada entre la hélice α -8a y la hélice α -8b de la proteína Cry1Aa. En cuanto a las asas 1, 2 y 3, en ambas proteínas éstas se encuentran entre la lámina $\beta 1$ y $\beta 2$ (asa 1); entre la lamina $\beta 6$ y $\beta 7$ (asa 2) y finalmente entre la lámina $\beta 10$ y $\beta 11$ (asa 3).

En la asa 1 del dominio II de las toxinas Cry1A (Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac) esta formada por dos aminoácidos conservados: Arg₃₁₁ y Gly₃₁₂, los cuales no han sido sujetos a estudios genéticos como mutaciones, deleciones o sustituciones. Por el contrario mediante mutaciones en los aminoácidos adyacentes (₃₁₃FNY₃₁₅) de la toxina Cry1Aa, se ha observado que el cambio de ₃₁₃FNY₃₁₅ por ₃₁₃AAA₃₁₅ en esta toxina mutante no afecta la constante de disociación (K_d) toxina/ receptor con respecto al tipo silvestre en *B. mori*; pero la toxicidad de la proteína mutante es hasta 10 veces menor con respecto a la toxina silvestre. El asa I del dominio II de la toxina Cry3A esta formada por los aminoácidos ₃₅₀YYGND₃₅₄, mutaciones puntuales (N₃₅₃A y D₃₅₄A) en esta asa resultan en una proteína que pierde completamente su toxicidad y capacidad de unirse a las VMVA del escarabajo *Tenebrio molitor*.

El asa 2 del dominio II de la toxina Cry3A consiste de los residuos Pro₄₁₂ y Ser₄₁₃; se ha observado que la sustitución de estos aminoácidos por alanina no afecta ni la toxicidad ni la capacidad de unión a VMVA del escarabajo *T. molitor*. Por el contrario, en la toxina Cry1Aa el asa 2 tiene una longitud de 13 aminoácidos (₃₆₇RRILGSGPNNQE₃₇₉), mientras que en Cry1Ab y Cry1Ac la longitud es de 11 aminoácidos (₃₆₃RRPFNIGINNQ₃₇₃). Mediante remociones y sustituciones en estas asas se ha determinado que los dos residuos de arginina al principio del asa en ambas toxinas afectan la interacción entre el receptor y la toxina (unión reversible), mientras que mutaciones en el resto de los aminoácidos hidrofóbicos afectan la unión irreversible.

El asa 3 del dominio II en las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac comprende los aminoácidos ₄₃₈SGFSNSSVS₄₄₆. Mutaciones de cada uno de estos aminoácidos por alanina han demostrado una reducción en la toxicidad; también se ha determinado mediante competencia heteróloga que los aminoácidos Gly₄₃₉ y Phe₄₄₀ están involucrados en la unión reversible de la toxina Cry1Ab en VMMA de *M. sexta*. En la toxina Cry3A el asa 3 comprende los aminoácidos ₄₈₁MQGSRG₄₈₆;

mutantes con una sustitución de estos aminoácidos por alanina presentan una reducción en la unión reversible, pero presenta una mejor unión irreversible, lo cual relaciona con un aumento en la toxicidad, según experimentos realizados con el escarabajo *T. molitor*.

En un trabajo realizado por Flores *et al.* (1997) se demostró que el fragmento aislado correspondiente al dominio II y III de la toxina Cry1Ab, mantiene su capacidad de unirse a la microvellosidad apical de células de intestino de los insectos *M. sexta* y *Trichoplusia ni* demostrando que esta región de la toxina mantiene su capacidad de unión en ausencia del dominio I.

1.5.2 Dominio III

Respecto al dominio III de la toxina Cry1Ca se ha demostrado mediante intercambio del dominio III de la toxina Cry1Ab (la cual es tóxica para el insecto *M. sexta*) por aquel de la toxina Cry1Ca (tóxica hacia el género *Spodoptera*) que la toxina quimérica presenta una mayor toxicidad en comparación con las toxinas parentales hacia ambos insectos y que además hay una alteración en el reconocimiento de proteínas de la membrana apical del intestino medio de *Spodoptera exigua* (de Maagd *et al.*, 1996). La conclusión del trabajo es que el dominio III de la toxina Cry1Ca tendría un papel importante en el nivel de toxicidad hacia su organismo blanco y más importante aún es el resultado de que el dominio III de Cry1Ca pudiera estar involucrado en el reconocimiento y unión de proteínas de membrana de intestino medio de *S. exigua*.

En un trabajo posterior de Maagd *et al.* (2000) reportan la construcción de diferentes toxinas quiméricas en las cuales se intercambió el dominio III de la toxina Cry1Ca por aquel de las toxinas parentales Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ea y Cry1Fa con el fin de determinar el papel del dominio III de la toxina Cry1Ca en la especificidad hacia su organismo blanco así como la toxicidad de las diferentes toxinas híbridas en larvas de *S. exigua*. De las toxinas quiméricas construidas, la toxina híbrida Cry1Da- Cry1Ca pierde totalmente su toxicidad hacia *S. exigua* mientras que el resto de las construcciones presenta una toxicidad superior a aquella de las toxinas parentales por separado. Puesto que hay una variación en los valores de mortalidad entre las diferentes construcciones se especula que habría alguna modulación en la actividad tóxica por parte de los dominios I y II de las toxinas silvestres en las construcciones. La conclusión importante de este trabajo es que independientemente del origen del dominio I y II, el dominio III de la toxina Cry1Ca determina la especificidad, en este caso, hacia larvas de *S. exigua* y que toxinas silvestres que originalmente no matan a este insecto (Cry1Ba y Cry1Ac) o que presentan una toxicidad menor en comparación con la toxina silvestre Cry1Ca (Cry1Ab y Cry1Fa) al presentar el dominio III de Cry1Ca aumentan su actividad tóxica.

También se han hecho mutantes en Cry1Aa y Cry1Ac en las cuales se intercambia el dominio III; la toxina Cry1Aa se une a un receptor de 210 kDa y la toxina Cry1Ac se une a un receptor de 120 kDa en el insecto *Lymantria dispar*; al

hacer el intercambio de dominios entre ambas toxinas tenemos que la toxina Cry1Aa (con el dominio III de Cry1Ac) se une ahora al receptor de 120 kDa y la toxina Cry1Ac (con el dominio III de Cry1Aa) reconoce ahora al receptor de 210 kDa; lo cual sugiere un papel importante del dominio III en el reconocimiento del receptor (Kyong et al., 1995).

En el proceso de intoxicación causado por las toxinas Cry, el último síntoma observado es la muerte del insecto. Se ha propuesto que las proteínas Cry inactivan al sistema que mantiene el gradiente de pH, así mismo crean un desbalance osmótico debido a la formación del poro lo cual resulta en la ruptura de las células del intestino. Las proteínas Cry aumentan la permeabilidad de la microvellosidad apical a cationes, aniones, agua y moléculas de mayor tamaño (Bravo, A. y Soberón, M., 2000). Se cree que la alcalinización del citoplasma es el efecto más devastador ya que interviene en el metabolismo celular normal y resulta en la destrucción del epitelio intestinal. También se ha demostrado que en ciertos casos hay un efecto sinérgico entre las esporas y las proteínas Cry (Bravo, A. y Soberón, M., 2000; Lorence, 1997).

2. Antecedentes.

El gen de la protoxina Cry1Ca tiene un tamaño de 3 567 pares de bases (pb) y codifica para una protoxina de 1 189 aminoácidos. La activación de las toxinas Cry requiere de cortes en el extremo amino y carboxilo de la secuencia de aminoácidos; en este caso se cortan los primeros 32 aminoácidos del extremo amino y 571 aminoácidos del extremo carboxilo. La forma activa de la toxina tiene un tamaño de 586 aminoácidos.

El dominio II de la toxina Cry1Ca también tiene un papel muy importante en la especificidad de esta toxina. En un estudio realizado por Smith, P. y Ellar, J. (1994) se determinaron las regiones correspondientes a las asas 1 y 2 de la toxina Cry1Ca mediante alineamiento múltiple y predicción de estructura secundaria tomando como referencia a la toxina Cry3A. De este trabajo se determinó que la secuencia de aminoácidos para el asa 1 es: ³¹⁷GRNF₃₂₀; y aquella para el asa 2 es: ³⁷⁴QPWP₃₇₇. Se realizaron mutaciones sitio dirigidas en diferentes aminoácidos utilizando oligonucleótidos degenerados en reacción de PCR. La actividad tóxica se analizó mediante un ensayo de lisis en línea celular de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) y ensayos de mortalidad en larvas de mosquito *Aedes aegypti*.

La mayoría de las mutantes en el asa 1 y asa 2 presentaron cambios significativos en la toxicidad hacia *Aedes aegypti*.

- La mutante R₃₁₈I es tóxica contra Sf9 pero no es tóxica hacia *A. aegypti*.
- La mutante Q₃₇₄E elimina la toxicidad hacia la línea celular Sf9 y larvas de mosquito *A. aegypti*.
- La mutante P₃₇₇A es tóxica para Sf9 (60%) pero no es tóxica para *A. aegypti*.

Los autores concluyen que las asas 1 y 2 podrían representar las regiones mínimas determinantes tanto de la especificidad como de la toxicidad de la toxina Cry1Ca. Sin embargo en este trabajo no se analizaron mutantes en el asa 3 o en regiones fuera de las asas en la toxina. Tampoco se comprobó que la actividad de las diferentes mutantes contra la línea celular Sf9 correlacionaba directamente con la toxicidad hacia larvas de *Spodoptera frugiperda*.

En un trabajo reportado por Abdul-Rauf, M: y Ellar, D.J. (1999) se realizó una mutagénesis puntual en las asas 2 y 3 de la toxina Cry1Ca analizando la toxicidad contra larvas del lepidóptero *Spodoptera littoralis* y el díptero *Aedes. aegypti*. El modelamiento de la estructura de la toxina Cry1Ca se realizó con el programa PEPTIDE- STRUCTURE, mediante un alineamiento de secuencia con la toxina Cry3A. La secuencia de aminoácidos reportada para el asa 2 ya ha sido reportada previamente (³⁷⁴QPWP₃₇₇) mientras que la secuencia de aminoácidos para el asa 3 reportada en este trabajo es: ⁴³⁶QRSGTPF₄₄₂.

Respecto a las mutaciones puntuales en el asa 2 (³⁷⁴QPWP₃₇₇), los autores reportan que:

- La mutante Q₃₇₄E perdió completamente su toxicidad hacia ambos insectos.
- La mutante P₃₇₇A presenta una toxicidad similar a la cepa silvestre en larvas de *S. littoralis* mientras que no es tóxica hacia larvas de *A. aegypti*.

En cuanto a las mutantes puntuales en el asa 3 (⁴³⁶QRSGTPF₄₄₂), los autores reportan que:

- Las mutantes S₄₃₈F y G₄₃₉A perdieron totalmente su toxicidad hacia ambos insectos.
- La mutante S₄₃₈Y pierde completamente su toxicidad hacia *S. littoralis* y mantiene una actividad del 87% en *A. aegypti*.

Los autores reportaron que las mutantes puntuales en el asa 2 afectadas en toxicidad perdieron afinidad por las vesículas de la microvellosidad apical, lo cual confirma la importancia de la interacción toxina-receptor en la toxicidad hacia el insecto blanco.

Estos cambios puntuales en el asa 1, 2 y 3 muestran la importancia de un solo aminoácido en la determinación de especificidad y toxicidad en ambos insectos así como en la línea celular Sf9.

Como podemos observar la estrategia experimental de ambos trabajos fue determinar las secuencias de aminoácidos de las aspas 1, 2 y 3 de la toxina Cry1Ca y posteriormente realizar los cambios puntuales en estas regiones a fin de determinar su papel en la toxicidad hacia los insectos seleccionados. Ninguna de las mutantes construidas presentan mayor actividad tóxica con respecto a la toxina silvestre.

Puesto que es de gran importancia el conocimiento del mecanismo de acción de las proteínas Cry dada su utilidad como bioinsecticidas no agresivos al medio ambiente y altamente específicos, es vital el entender a nivel molecular como funcionan las δ - endotoxinas producidas por *Bacillus thuringiensis*. La importancia del conocimiento básico del mecanismo general de acción de las proteínas Cry permitirá desarrollar mejores bioinsecticidas, ampliar el espectro de acción a otros insectos, tener alternativas frente el desarrollo de resistencia por parte de estos y sobre todo asegurar una menor pérdida de cosechas debido a que muchos de los insectos constituyen verdaderas plagas para el campo; y más importante aun, la disminución en el uso de pesticidas químicos como solución a las infestaciones causadas por insectos.

En este sentido la búsqueda y caracterización de nuevas toxinas así como el desarrollo de nuevas mutantes constituyen una importante herramienta en el conocimiento en general de las proteínas con actividad insecticida de *Bacillus thuringiensis*.

En este trabajo nos enfocaremos a la toxina **Cry1Ca**, la cual es tóxica para dos insectos devastadores en maíz: *Spodoptera frugiperda* y *Spodoptera exigua*.

El propósito del presente trabajo es la caracterización de mutantes en el dominio II de la toxina Cry1Ca, las cuales fueron construidas por el Dr. Didier Lereclus (Instituto Pasteur). Las mutaciones aleatorias dentro del dominio II de la toxina Cry1Ca fueron elaboradas mediante PCR mutagénico (ver materiales y métodos). Este acercamiento experimental tiene la ventaja de que se pueden tener mutantes en la totalidad de la región de interés, en este caso, la secuencia de aminoácidos del dominio II de la toxina Cry1Ca y por lo tanto es una forma diferente (a aquella de hacer mutantes puntuales) para abarcar el problema de determinar las regiones o aminoácidos importantes en actividad del dominio II de la toxina Cry1Ca.

Objetivo: Determinar los aminoácidos críticos del dominio II que estuvieran directamente relacionados con la toxicidad de la toxina Cry1Ca sobre su organismo blanco: *Spodoptera frugiperda*.

Hipótesis: Podemos determinar la importancia de un aminoácido o aminoácidos en el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ca. Además pudiesen existir otras regiones del dominio II, diferentes a las asas, importantes para la interacción toxina-receptor.

3. Materiales y métodos:

3.1 Cultivo de la bacteria.

La cepa silvestre y demás cepas mutantes se crecieron en 250 ml de medio SP liquido, pH 7, adicionado con eritromicina (10 μ g/ml) por un periodo de 72 hrs. con agitación (250 rpm) y una temperatura de 30°C, periodo en el cual se observa prácticamente esporulación total del cultivo.

Medio SP (esporulación)	1L
Caldo nutritivo	8g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.25g
KCl	1g
Solución I: MnCl ₂	1ml
Solución II: FeSO ₄ 1N	2ml
H ₂ SO ₄ concentrado	
Solución III: CaCl · 2H ₂ O 0.5 M final	1ml

3.2 Bioensayos de toxicidad en larvas de *Spodoptera frugiperda* y *Aedes aegypti*.

Los bioensayos de toxicidad se realizan con mezcla espora-cristal y con larvas de *Spodoptera frugiperda* neonatas o de primer estadio de desarrollo en placas de 24 pozos con capacidad de 4ml. En cada pozo se colocan 2ml de dieta artificial (harina de soya, germen de trigo, sales weson, sacarosa, metilparabeno, ácido ascórbico, ácido sórbico, formaldehido 10%, ácido acético 25%, vitaminas vandersatz y cloruro de colina 15%) y se agrega un volumen final de 35 μ l de la concentración (ng/cm²) de mezcla esporas-cristal que queremos ensayar. En cada pozo colocamos una larva y los resultados de mortalidad se cuantifican a los 7 días. En cada bioensayo se coloca un control negativo, en este caso agua. El control positivo es la cepa silvestre. Cada bioensayo se realiza por triplicado.

Los bioensayos de toxicidad se realizaron contra larvas de *A. aegypti* de tercer estadio de desarrollo en un volumen final de agua y mezcla espora cristal de 100 ml. Por cada dosis a ensayar se utilizaron 20 larvas de *A. aegypti*. La mortalidad se cuantifica a las 24 hrs. El control positivo es la cepa silvestre y el control negativo es agua.

3.3 Determinación de concentración de proteína (método de Bradford).

La determinación de concentración de proteína por el método de Bradford se realiza midiendo absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un volumen final de 1ml en espectrofotómetro (Pharmacia). Para ello colocamos una muestra de la solución a determinar la concentración de proteína y la llevamos a un volumen de 800 μ l con H₂O MQ y adicionamos 200 μ l de reactivo de Bradford

(Bio-Rad) en un volumen final de 1ml. La curva de referencia se realiza con albúmina sérica de bovino.

3.4 Purificación de cristales por gradiente discontinuo de sacarosa.

Se recupera cultivo celular de medio líquido SP por centrifugación a 10 000 rpm durante 10 minutos.

La pastilla se resuspende perfectamente en 30 ml de solución de NaCl 500 mM + EDTA 10 mM, pH 8; posteriormente la muestra se centrifuga 10 minutos a 10 000 rpm. El proceso se repite cinco veces, tratando de eliminar lo mejor posible a las esporas.

La pastilla se resuspende en 5 ml de buffer TTN (Tris- HCl 20 mM, NaCl 300 mM, Tritón X-100 0.1%, pH 7.2) y se sonica a la muestra dando tres pulsos de 50 segundos por un minuto de descanso a 4°C, a fin de desbaratar los grumos de esporas-cristales.

Para el gradiente discontinuo utilizamos cinco concentraciones de sacarosa (sigma): 63, 67, 72, 79 y 84% con un volumen de 6 ml cada una.

Utilizamos tubos para ultracentrífuga (Beckman Intruments Inc.) y colocamos el volumen correspondiente a las concentraciones antes mencionadas en un orden de mayor a menor concentración. Por último colocamos la muestra de esporas cristal resuspendida y sonicada en solución amortiguadora TTN, en un volumen final de aproximadamente 5 ml. Se calibran los tubos y las muestras se centrifugan 20 minutos a 23 000 rpm y 15°C.

Las fracciones obtenidas se recuperan por separado y se realizan lavados con 30 ml de agua + tritón X-100 al 0.01%; para ello las fracciones obtenidas se mezclan con dicho amortiguador a un volumen aproximado de 30 ml, se mezclan perfectamente y se centrifugan 10 minutos a 10 000 rpm. El proceso se repite cinco veces.

La pastilla obtenida se solubiliza en amortiguador Tris HCl 1M pH 8. Se determina mediante observación al microscopio óptico la presencia de los cristales de proteína en las fracciones obtenidas. Generalmente tenemos que el grueso de los cristales se obtuvieron en las fracciones con una concentración de sacarosa de 72% y 79% y finalmente realizamos alicuotas de 1ml del volumen final de cada una de las fracciones adicionando PMSF a una concentración final de 1mM. Las alicuotas se almacena a 4°C hasta su posterior uso.

3.5 Solubilización de cristales (obtención de protoxina).

Tomamos una alícuota de cristales purificados por gradiente discontinuo de sacarosa y determinamos la concentración de proteína por el método de Bradford. Tomamos un volumen correspondiente a 400 µg de proteína y centrifugamos

brevemente para bajar la pastilla, desechamos el sobrenadante y resuspendemos la pastilla en 600 μ l de solución de carbonatos 1X (NaCO_3 0.1 M + NaHCO_3 0.1 M, pH 10.5 y 2-mercaptoetanol al 0.2% v/v).

Las muestras se incuban 2 hr a 37°C con agitación, posteriormente la muestra se centrifuga 10 min. a 10 000 rpm y se recupera el sobrenadante y se determina la concentración de protoxina por método de Bradford.

3.6 Corte con tripsina (obtención de toxina).

Preparamos una solución de tripsina a una concentración final de 10 mg/ ml en amortiguador de solubilización de tripsina (HCl 1 mM y CaCl_2 20 mM).

Tomamos un volumen correspondiente a 200 μ g de solución de protoxina y adicionamos una quinta parte de este volumen de Tris HCl 1M pH 7.4 para bajar el pH de la solución a aproximadamente 8.3; posteriormente agregamos tripsina a una concentración final de 1:20 m/m. Incubamos las muestras 1 hr a 37°C con agitación.

Detenemos la reacción adicionando PMSF a una concentración final de 1mM. Finalmente centrifugamos la muestra 10 min. a 14 000 rpm y recuperamos el sobrenadante a fin de eliminar agregados no solubles y filtramos la muestra con filtros de baja afinidad a proteína no estériles (Millipore) con diámetro de poro de 0.45 μ m.

3.7 Ensayo de estabilidad estructural mediante resistencia a degradación proteolítica.

En este ensayo colocamos diferentes relaciones de tripsina/ protoxina (1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000 y 1:5000) para la cepa silvestre. En cuanto a las cepas mutantes utilizamos las siguientes relaciones de tripsina/ proteína: 1:20, 1:50, 1:200, 1:1 000 e incluso 1:5000.

Incubamos las muestras 1 hr a 37°C con agitación. Inactivamos tripsina con PMSF a una concentración final de 1mM. Tomamos una muestra de toxina y llevamos a 15 μ L con PBS 1X + ML 4X (Glicerol concentrado, Tris 0.5M, pH 6.8, SDS, mercaptoetanol y azul de bromofenol). Por último, calentamos la muestra en agua hirviendo durante 4 min. Cargamos en gel de poliacrilamida al 10% (30% acrilamida, 1.5 M Tris pH 8.8, 10% SDS, 10% APS y TEMED). Teñimos el gel con colorante azul de Coomassie (Bio- Rad).

3.8 Marcaje de toxina con biotina.

Se colocan 200 μ l de solución de toxina dializada soluble y se le adicionan reactivo (biotina-N-hidroxisuccinimida, Amersham) a una relación de 0.5 mg. de proteína/

20µl de reactivo para biotinación. La muestra se deja incubando durante 1 hr. a temperatura ambiente.

Se preparan columnas de Sephadex G25 (Sigma) equilibradas con 40 ml de buffer PBS 1X. Se colocan las columnas en centrifuga y se centrifugan 5 min. a 2,000 rpm a fin de desechar completamente los residuos de PBS 1X. La toxina biotinada se hace pasar por las columnas y se centrifuga a 2,000 rpm durante 5 min. Determinamos concentración de toxina por el método de Bradford. Posteriormente tomamos 1ml de toxina en solución y dializamos en bolsas con poros de 40 kDa de diametro toda la noche en solución de boratos (ácido bórico 50 mM + 10 ml de NaOH 5M + 30 ml de NaCl 5M, pH 8.6) en relación 1:1000. Determinamos concentración de toxina dializada por el método de Bradford.

Observación de la toxina biotinada en SDS-PAGE.

La biotina se une mediante el grupo amino terminal y el grupo ε- amino de la lisina en las δ- endotoxinas. El marcaje de proteína con biotina tiene varias ventajas sobre otros métodos de marcaje, por ejemplo, marcaje con radioisótopos:

- a) Se pueden marcar cantidades mínimas de proteína (0.1 a 0.3 mg/ml)
- b) Es sumamente inocua.
- c) Las proteínas biotinadas pueden almacenarse hasta por dos meses sin perder su actividad.
- d) La afinidad del complejo biotina- avidina, constante de disociación (K_d : 10^{-15} M), es mucho mayor que la afinidad de un anticuerpo monoclonal a su antígeno (K_d : entre 10^{-9} y 10^{-10}).

Se cargan 2 µg de toxina biotinada en un gel desnaturalizante de poliacrilamida y posteriormente se transfiere a una membrana de nitrocelulosa. Utilizamos marcador biotinado de amplio espectro (Bio-Rad). La transferencia se realiza en cámara de transferencia (Amershan) utilizando solución de transferencia (Tris-glicina sin SDS + metanol absoluto al 20%). Las condiciones de transferencia son: 300 mA durante 1 hr a 4°C.

La membrana de nitrocelulosa se bloquea con 50 ml de buffer PBS 1X + Tween 20 al 2% durante 20 min. Se realizan 2 lavados de 10 min. con PBS1x + Twen20 al 0.1%. Posteriormente la membrana se incuba durante 1 hora con agitación en amortiguador PBS 1X + tween20 al 0.1% y estreptavidina acoplada a peroxidasa de Amerham Life Sciences, en una relación 1:4000 v/v. Se realizan 2 lavados adicionales de 15 min. con PBS 1X + Tween 20 al 0.1%. Se realizan 2 lavados adicionales de 10 min. con buffer de PBS 1X.

Se incuba la membrana de nitrocelulosa con "luminol Super Signal Chemiluminiscent Substrate" (Pierce) en relación 1:1 con agitación constante durante 1 min. y la señal se imprime en películas para quimioluminiscencia (Amerham Pharmacia Biotech).

3.9 Preparación de vesículas de la microvellosidad apical (VMVA) de células de intestino medio de *S. frugiperda*.

Las vesículas de la microvellosidad apical de intestino del insecto se prepararon de acuerdo al procedimiento descrito por Wolfersberger *et al.* (1987) mediante precipitación con magnesio y centrifugación diferencial. Mediante este procedimiento el magnesio interacciona preferencialmente con las membranas vaso-laterales y demás membranas de las células del intestino, permitiendo separar a las membranas de la microvellosidad apical.

Para ello se toman larvas de *S. frugiperda* de quinto estadio de desarrollo y se disecta el intestino medio, se hace un corte longitudinal y se desecha el contenido posteriormente se enjuaga el fragmento de intestino en solución de disección (EGTA 5 mM, Manitol 300 mM, Tris HCl 17mM pH 8, DTT 2mM, PMSF 0.1 mM, 50 μ l de leupeptina 10 mg/ml y 50 μ l de pepstatina 100 mg/ml. Ajustamos el pH final a 7.4 y aforamos a 100 ml) y se coloca en tubo eppendorf en hielo seco. Los intestinos se almacenan en congelación a -70°C para su posterior uso.

Para la preparación de VMVA tomamos 3g de muestra de intestinos:

- Diluimos 1:10 p/v en solución fría de disección de intestinos (30 ml).
- Colocamos los intestinos en homogenizador esteril en un taladro Black & Decker U-114 tipo FV. Damos 9 golpes a 2250 rpm.
- Colocamos un volumen igual (30 ml) de solución 24 mM de MgCl_2 , agitamos suavemente y dejamos incubando en hielo durante 15 min.
- Centrifugar la muestra a 4500 rpm durante 15 min. a 4°C en rotor Beckman JA-20 y recuperamos el sobrenadante en tubo estéril.
- Centrifugamos el sobrenadante a 16 000 rpm durante 30 min. a 4°C y desechamos el sobrenadante.
- Resuspendemos la pastilla en medio volumen (15 ml) de solución de disección de intestinos y medio volumen de MgCl_2 24 mM (15 ml).
- Repetimos el proceso de centrifugado a 4 500 y 16 000 rpm.
- Finalmente resuspendemos la pastilla en solución 1:1 de amortiguador de disección y agua desionizada. El volumen se agrega de acuerdo al tamaño de la pastilla obtenida (aproximadamente 700 μ l) y hacemos alícuotas colocando 40 μ l en tubos eppendorf de 500 μ L; almacenamos a -70°C .

3.10 Ensayo de unión de toxina biotinada a VMVA.

En los ensayos de unión utilizamos 10 nM de toxina marcada con biotina (toxina*) y 10 μ g de vesículas de la microvellosidad apical de células de intestino de insecto (VMVA) en un volumen final de 100 μ l de buffer de unión (PBS 1X + albúmina sérica de bovino al 0.1% + Tween20 0.1%)

La muestra se incuba 1 hr. a temperatura ambiente. Posteriormente la muestra se centrifuga 10 min. a 14 000 rpm y se desecha el sobrenadante. La pastilla se

resuspende en 100 μ l de amortiguador de unión y el proceso se repite dos veces a fin de lavar la toxina* no unida a las vesículas.

Al final la pastilla se resuspende en 15 μ l de PBS 1X+ 4 μ l de muestra lítica 4X (ML4X). La muestra se calienta 4 min. en agua hirviendo y se carga en gel de acrilamida al 9% con las condiciones siguientes: 8mA en gel de empacamiento y 16 mA en gel de corrida. Utilizamos marcador biotinado de amplio espectro. En un carril colocamos solamente 10 μ g de vesículas como control negativo.

3.11 Ensayo de competencia homóloga.

Mediante un ensayo de competencia homóloga se determina la afinidad de la toxina Cry1Ca biotinada por su receptor en presencia de un competidor; en este caso la toxina silvestre sin marcar. El procedimiento a seguir en este ensayo es el siguiente:

Se preparan vesículas de la microvellosidad apical (VMMA) de *S. frugiperda* a las cuales se hace interaccionar con una concentración determinada de toxina marcada con biotina y diferentes concentraciones de toxina no marcada ("fría") a temperatura ambiente en un volumen determinado de solución de unión. Posteriormente, se centrifugan las muestras y se resuspende en solución de unión para quitar el exceso de toxina que no se unió a las VMMA; esta muestra es calentada 4 min. a baño maría en agua hirviendo y la colocamos en un gel de acrilamida al 9%. La toxina no marcada compite con la toxina biotinada en la unión a las vesículas, así que esperamos observar una menor cantidad de toxina marcada conforme aumentamos la concentración de competidor. Después del proceso de electroforesis, las proteínas son transferidas a un papel de nitrocelulosa el cual es incubado con un conjugado de estreptavidina- peroxidasa y revelado con luminol. La marca se visualiza en una placa de revelado.

3.12 Determinación de secuencia de aminoácidos del dominio II de toxinas mutantes.

La secuencia de nucleótidos en el dominio II de las cepas mutantes se determinó mediante secuenciación de doble cadena en la unidad de secuencia del Instituto de Biotecnología, UNAM. Mediante alineamiento de secuencia de aminoácidos entre el dominio II de la cepa silvestre y dominios II de las cepas diferentes cepas mutantes se determinaron las mutaciones presentes dentro del dominio II de las cepas mutantes. Para delimitar el dominio II de la toxina Cry1Ca se diseñaron dos oligos mediante el alineamiento con la secuencia de aminoácidos de la toxina Cry1Aa y se sintetizaron en la unidad de síntesis del mismo instituto.

Oligo derecho: 5' **GAT ATC GCC GCT TTC TTT CC** 3'

Oligo reverso: 5' **CTC TAA ATC CTT TCA CTA AAG G** 3'

El gen de la toxina Cry1Ca cuenta con 1 758 pares de bases y el dominio dos comprende las bases 661 a 1 266, esto es 606 pares de bases correspondientes a 202 aminoácidos. El oligo derecho corresponde a las bases 625 a 644 y se localiza en el dominio I de la toxina, mientras que el oligo reverso se ubica en las bases 1 315 a 1 336 dentro del dominio III de la toxina Cry1Ca.

3.13 Modelo teórico de la estructura de la toxina Cry1Ca.

El modelo teórico de la toxina Cry1Ca fue generado a partir de la estructura tridimensional de la toxina Cry1Aa, de la cual se tiene reportada su estructura por cristalografía de rayos X (Grochulsky et al., 1995).

Para generar el modelo tridimensional de una proteína a partir de la estructura de otra proteína homóloga de la cual ya se cuenta con modelo tridimensional (cristalografía de rayos X y RMN) se tiene que considerar por una parte el alineamiento entre las secuencias de proteína, así como la calidad de la estructura reportada de la proteína que vamos a utilizar como "plantilla" o molde.

En primer lugar se realiza un alineamiento a nivel de secuencia de aminoácidos entre la toxina Cry1Aa y la toxina Cry1Ca, con el fin de determinar cualquier similitud significativa, así como la identidad de aminoácidos de ambas secuencias. Incluso se puede mejorar el alineamiento entre las dos secuencias al hacer un alineamiento múltiple con las proteínas pertenecientes a la misma familia (Cry); también se pueden mejorar los resultados de alineamiento mediante métodos de alineamiento global y local. Si la identidad de la secuencia entre dos proteínas es mayor a 50%, una secuencia puede ser traslapada con la estructura de la otra secuencia y el modelo teórico obtenido sería bastante exacto. Si la similitud entre ambas proteínas es mayor a 30% es posible identificar características estructurales comunes (Mount, 2000).

En el programa InsightII módulo Homology (Accelrys) colocamos el archivo PDB (Protein Data Bank) de la toxina Cry1Aa (molde) y quitamos las cadenas laterales para obtener sólo el esqueleto de carbonos de la toxina. Al esqueleto de carbonos de la toxina Cry1Aa se le colocan las cadenas laterales de la toxina Cry1Ca (de la cual queremos obtener el modelo) considerando inserciones y deleciones en la secuencia de aminoácidos. Esto nos resulta en un modelo teórico inicial de la toxina de interés en el cual estaríamos "mimetizando" la posición de los átomos en el espacio a partir de una estructura ya conocida. Posteriormente, hacemos una minimización energética del modelo inicial en el programa CNS (Brunger et al., 1998). Este procedimiento se realiza con el fin de optimizar las interacciones entre los átomos del modelo teórico; consiste en cambios sucesivos de la estructura del modelo teórico hasta que se tiene un valor de energía que representa un equilibrio entre la estructura de la proteína y el valor de energía. Una vez que hemos hecho la minimización energética del modelo teórico (toxina Cry1Ca) hacemos un empalme con la estructura de la proteína conocida, en este caso la toxina Cry1Aa. Como una medida de calidad del modelo teórico la

desviación estándar del empalme entre ambos modelos no debe ser mayor a 2Å y con lo cual podemos decir que tenemos un modelo preliminar.

Por último, este modelo preliminar aún puede mejorarse mediante el programa "O" (Jones et al., 1991), en el cual se realiza un ajuste manual, aminoácido por aminoácido, de las interacciones entre los aminoácidos del modelo; por ejemplo, seleccionando isómeros de aminoácidos con los cuales hay una mejor interacción con aminoácidos vecinos dentro del modelo generado de la proteína.

3.14 Células competentes.

Sembrar células DH5 α sobre medio SOB sólido y crecer 12 hrs a 37°C; transferir 4 ó 5 colonias bien aisladas en 1 ml de medio SOB líquido + 20mM MgSO₄; el cultivo se diluye en 100 ml de medio SOB + 20mM MgSO₄ en un matraz Erlenmeyer de 1L previamente calentado a 37°C; el cultivo se crece hasta una densidad óptica entre 0.43 y 0.48 a 550 nm; el cultivo se transfiere a tubos para centrifuga y se deja en hielo 5 min., se centrifuga a 10,000 r.p.m. a 4° C durante 5 min. Se desecha el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 40 ml de medio Tfb1 frío; se deja 5 min. en hielo y se centrifuga durante 5 min. a 10,000 r.p.m. y 4°C; la pastilla se resuspende en 4 ml de Tfb2 frío, se deja 15 min. en hielo; se reparte en alícuotas de 20 μ L en tubos Eppendorf previamente enfriados en hielo seco. Las células se conservan a -70°C.

Medio SOB	
Bactotripton	20g
Extracto de levadura	5g
NaCl	0.5g
H ₂ O cbp	950 mL

Una vez que se disolvieron los reactivos se le agregan 10 ml de KCl 250 mM. Se ajusta el pH a 7 con NaOH, se ajusta el volumen a 1L y se esteriliza por autoclave.

Antes de usar el medio se le agregan 5 ml de una solución estéril de MgCl₂ 2 mM.

Tfb1	
CH ₃ COOK	30mM
LiCl	100mM
CaCl ₂	10mM
MgCl ₂	50mM
Glicerol concentrado	15%
Ajustar pH a 5.8 con ácido acético; esterilizar por filtración.	

Tfb2	
MOPS	10mM
CaCl ₂	75mM

LiCl 10mM
 Glicerol concentrado 15%
 Ajustar pH a 6.5 con KOH; esterilizar por filtración.

3.15 Transformación de *E. coli*.

Se toman 50 μ l de células competentes, se descongelan en hielo y se les adicionan 50 μ g de ADN. Se deja incubando 30 min. La mezcla de reacción se pone a 42°C por 90 seg. y se pone en hielo durante 2 min. Se le agregan 200 μ L de medio LB y se deja incubando a 37°C durante una hora. Se toman 50 μ l y se extienden en una caja Petri con medio de cultivo LB adicionado con ampicilina.

3.16 PCR mutagénico.

El gen de la toxina Cry1Ca se encuentra en el plásmido pHTIC el cual tiene un origen de replicación para *E. coli* y un origen de replicación para *B. thuringiensis*; además cuenta con el gen de resistencia a ampicilina (Ap^R) para *E. coli* y eritromicina (Em^R) para *Bt*. En el gen de la toxina Cry1Ca se insertaron los sitios de restricción XhoI y BspEI para delimitar el dominio II de dicha toxina, el cambio de bases no afecta la secuencia de aminoácidos. En el lugar del Dominio II de la toxina se colocó el gen de resistencia a kanamicina; a este plásmido se le llamó pHT1C^ΔDII/ Km^R (Fig.9).

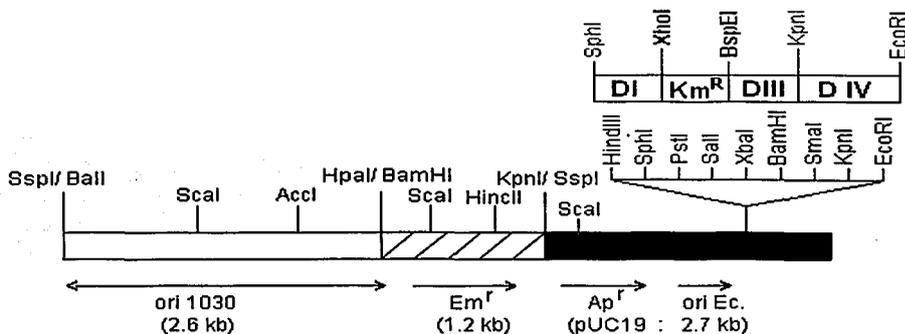


Fig.9. Representación esquemática del plásmido pHT1C^ΔDII/ Km^R . Este plásmido contiene un origen de replicación para *E. coli* ($ori Ec$) y *B. thuringiensis* ($ori 1030$); también contiene los genes de resistencia a ampicilina (Ap^R) para *E. coli* y a eritromicina (Em^R) para *Bt*. El gen de Cry1Ca se insertó mediante las enzimas *SphI* y *EcoRI*. DI y DIII: dominio I y dominio III de Cry1Ca, respectivamente. DIV: extremo carboxilo de la toxina. Km^R : gen de resistencia a kanamicina en lugar de dominio II de la toxina Cry1Ca.

El dominio II de la toxina Cry1Ca (606 pb) se insertó en el plásmido pUC19, esta construcción se llamó pIC-DII y cuenta con resistencia a ampicilina. Se utilizaron los oligos derecho, IC1 (5' GGC GGT ACC TCG AGA AGT TTA TAC GGA CCC ATT 3') y reverso, IC2.1 (5' GCG TCC GGA TCA ATT GTA TTT GTA AGA G 3') para hacer la reacción de PCR mutagénico.

Las mutaciones aleatorias dentro del dominio II de la toxina Cry1Ca fueron generadas por el Dr. Didier Lereclus (Instituto Pasteur) mediante PCR mutagénico, en el cual se modificó la concentración de dATP. Para ello, en la reacción de PCR, la concentración de dATP fue de 0.5 mM en comparación de los 5mM que se utilizaron del resto de dideoxi-nucleótidos. Se utilizó el siguiente protocolo de PCR:

95°C	10 min.	} Una vez
55°C	1 min.	
72°C	4 min.	} 25 ciclos
95°C	1 min.	
72°C	12 min.	} Una vez

Los productos de PCR fueron digeridos con *XhoI* y *BspEI* y clonados en el plásmido pHT1C^ΔDII/ Km^R digerido con las mismas enzimas para intercambiar el gen de resistencia a kanamicina por el dominio II mutado. Esta ligación se transformó en la cepa de *Bt* 407 Cry⁺ la cual es una cepa acristalífera. Así, en la reacción de PCR mutagénico se lleva a cabo utilizando como templado el plasmido pIC-DII y posteriormente se recuperan los dominios II mutados y se insertan en la secuencia original del gen de Cry1Ca. Para la selección de las colonias que llevarán plásmidos con la secuencia completa del gen *cry1Ca*, se buscaron colonias resistentes a eritromicina y sensibles a kanamicina.

3. 17 Marcaje radiactivo de la toxina Cry1Ca con ¹²⁵I.

El marcaje de la toxina Cry1Ca se realizó con Na¹²⁵I (ARC, Inc.) en un volumen de 100 μL finales de reacción. Utilizamos 0.5 mCi (5 μL) de Na¹²⁵I. El yodo interacciona con los aminoácidos tirosina de la toxina.

- Hidratamos 4g. de Bio-gel P-30 (Bio-Rad) en 50 ml de PBS 1X + 0.1% BSA por 1 hora a temperatura ambiente. Empacamos la columna y equilibramos con 50 ml de buffer de elución (PBS 1X + 0.1% BSA).
- Colocamos 1 "iodo-bead" (Pierce) en 100 μL de PBS 1X y posteriormente secamos con papel filtro. Colocamos la "iodo-bead" en tubo eppendorf de 1.5 ml y adicionamos 5 μL (0.5 mCi) de Na¹²⁵I. Incubamos a temperatura ambiente por 5 min. Finalmente agregamos la toxina Cry1Ca en un volumen de 95 μL (17μg de proteína). La muestra de reacción (100μL) se incubó por 15 min. a temperatura ambiente.
- Para separar el yodo libre de la toxina marcada pasamos la muestra (100μL) por una columna de Bio-gel P-30 (Bio-Rad) previamente hidratada. Eluimos la muestra con PBS 1X + 0.1% BSA.
- Recuperamos la muestra en fracciones de 500 μL y determinamos las cuentas por minuto por μL (cpm/ μL) de cada una de las fracciones obtenidas en el contador gamma.

Posteriormente elegimos de acuerdo a los valores de cpm/ μL en el contador gamma aquellas fracciones en las cuales pudiese estar la toxina marcada. Mediante gel de acrilamida al 10% con SDS determinamos que fracciones presentan la mayor concentración de toxina marcada y la menor concentración de yodo libre. Elegimos una fracción con la cual realizaremos los subsecuentes ensayos.

En los ensayos de competencia homóloga y heteróloga, la unión de la toxina marcada a VMVA de *S. frugiperda* se determino por el procedimiento de precipitación, en el cual una vez realizada la incubación de ^{125}I -Cry1Ca- VMVA se separa la ^{125}I -toxina no unida mediante precipitación por centrifugación. Se hacen dos lavados con 500 μL de buffer de elución y se cuantifica la señal de la toxina marcada unida a VMVA en el contador gamma.

Posteriormente se determina la concentración optima de VMVA de *S. frugiperda* para realizar los ensayos de competencia homóloga. Para ello incubamos 5, 10, 20 y 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de VMVA con toxina marcada (18000 cpm), 1 hora a temperatura ambiente y determinamos la señal en el contador gamma. Una vez elegida una concentración de VMVA a utilizar en los subsecuentes ensayos, se realiza un ensayo de incubación de ^{125}I -toxina- VMVA contra el tiempo a fin de determinar el periodo de incubación optimo. Para ello incubamos toxina marcada con yodo con una determinada concentración de VMVA a diferentes tiempos de incubación , realizamos los lavados por precipitación y determinamos la señal obtenida en el contador gamma.

En los ensayos de competencia homóloga incubamos a la toxina marcada con la concentración de VMVA determinada y adicionamos diferentes concentraciones de toxina Cry1Ca sin marcar. Posteriormente se hacen los lavados y se cuantifica la señal obtenida en el contador gamma. Finalmente en los ensayos de competencia heteróloga las diferentes concentraciones de competidor que se utilizan corresponden a las toxinas mutantes sin marcar que se quieren ensayar.

Centrifugamos las vesículas a 14 000 rpm durante 10 min. a 4 $^{\circ}\text{C}$ para retirar el buffer original y resuspender en amortiguador de elución a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

4. RESULTADOS.

En todos los ensayos llevados a cabo se utilizó la toxina Cry1Ca silvestre como referencia para comparar a las diferentes toxinas mutantes. La cepa utilizada como control es la cepa silvestre 407 CF3-1C de *Bt*.

4.1 Bioensayos de toxicidad en larvas de insectos susceptibles.

De un total de 500 cepas generadas por mutación aleatoria en el dominio II, se eligieron aquellas que producían cristal de proteína insecticida. Mediante observación al microscopio óptico de bacterias en la fase de esporulación. De esta primera selección, se obtuvieron un total de 120 cepas.

Posteriormente realizamos un bioensayo contra larvas de *Spodoptera frugiperda* con dos concentraciones de mezcla espora-cristal: 100 y 1000 ng/cm² (proteína total) a las 120 cepas que producen cristal. El criterio utilizado para seleccionar mutantes con mayor o menor toxicidad con respecto a la cepa silvestre fue el siguiente: una cepa mutante con menor actividad insecticida debería presentar una toxicidad menor al 25% con respecto a la cepa silvestre. Por el contrario una cepa mutante con actividad tóxica incrementada debería ser al menos dos veces más tóxica que la cepa silvestre a una concentración de espora-cristal determinada. De este primer bioensayo seleccionamos 26 cepas con una toxicidad diferente a la de la cepa silvestre; tanto con mayor toxicidad, como con una menor toxicidad (tabla 3). Posteriormente se repitió un segundo bioensayo con dos concentraciones de mezcla espora-cristal: 100 y 1000 ng/cm² para las cepas identificadas en el primer bioensayo como positivas; y 100 y 5000 ng/cm² para las cepas catalogadas como no tóxicas.

Tabla 3.
Bioensayos de toxicidad y selección de cepas mutantes.

Cepa	1° ensayo Mortalidad (%)		2° ensayo Mortalidad (%)			Características
	100 ng/ cm ²	1000	100	1000 ng/ cm ²	5000	
2	8	30	33	ND	96	Tóxica
4	12	12	0	0	ND	No tóxica
13	10	16	21	96	100	Tóxica
18	91	100	25	ND	67	Tóxica
22	87	100	25	42	ND	Tóxica
24	87	92	25	58	ND	Tóxica
28	87	96	8	58	ND	Tóxica
35	87	100	4	21	ND	Tóxica
40	96	92	12	54	ND	Tóxica
52	83	100	12	37	ND	Tóxica
53	83	100	0	21	ND	Tóxica
54	79	100	4	42	ND	Tóxica
89	54	79	17	ND	29	No tóxica
99	6	16	25	92	100	Tóxica
101	8	6	12	ND	21	No tóxica
103	17	17	25	ND	8	No tóxica
121	4	ND	17	ND	8	No tóxica
122	16	ND	50	ND	92	Tóxica
123	6	ND	87	100	100	Tóxica
127	17	ND	12	ND	92	Tóxica
132	0	ND	21	ND	87	Tóxica
135	10	ND	25	ND	21	No tóxica
160	80	ND	4	92	100	Tóxica
161	90	ND	8	25	ND	Tóxica
162	85	ND	12	25	ND	Tóxica
165	85	ND	12	37	ND	Tóxica
Wt	50	100	33	ND	100	Tóxica
Blanco	0	0	0	0	0	

Tabla 3. Resultados de bioensayos a 100, 1000 y 5000 ng/cm² para las cepas seleccionadas. Se muestra la mortalidad (%) de cada una de las cepas. Se indica en negrita a las cepas elegidas para continuar el trabajo de caracterización, así como el fenotipo que presentan. ND: no determinado.

De los resultados obtenidos en los bioensayos seleccionamos un total de 9 cepas mutantes, de las cuales seis cepas presentan una marcada disminución en toxicidad (cepas: 4, 89, 101, 103, 121 y 135); Tres (24, 28 y 40) fueron seleccionadas en el primer bioensayo por presentar una mortalidad mayor a la cepa silvestre. Sin embargo, en los resultados del segundo bioensayo observamos que estas mutantes presentan una toxicidad similar respecto a la cepa silvestre.

Para cada una de las cepas seleccionadas se realizaron bioensayos por triplicado a diferentes concentraciones de mezcla espora-cristal, (Tabla 4). No se incluyó a la cepa 89 debido a que se comprobó mediante SDS-PAGE que no produce proteína de cristal (Fig.9B). Tampoco incluimos a la cepa 103 pues ésta es sensible a procesamiento con tripsina, como veremos más adelante (Fig.10). Estos fenotipos explicarían la toxicidad prácticamente nula de este par de cepas. En cuanto a las cepas 28 y 40, por presentar una toxicidad similar a la cepa

silvestre y a la cepa 24, las excluimos de los bioensayos. Los bioensayos se realizaron con cinco concentraciones de proteína total (mezcla espora-cristal) para la cepa 24: 100, 300, 900, 2000 y 5000 ng/cm². para el resto de las cepas mutantes se utilizaron las siguientes concentraciones de mezcla espora-cristal: 1000, 2000, 4000, 10000 y 20000 ng/cm² (tabla 4). Por tanto se incluyo un control positivo (cepa silvestre) y un control negativo (blanco) para la cepa 24 y resto de cepas mutantes.

Tabla 4.

Determinación de LC₅₀ de cepas seleccionadas contra *Spodoptera frugiperda*.

Cepa	LC ₅₀ . ng/ cm ²
24	127±2.7
Silvestre	80±
Blanco	13.9±0.6
4	> 20 000
101	> 15 000
121	> 20 000
135	>20 000
Silvestre	< 1 000
Blanco	11.3±0.5

Tabla 4. Determinación de LC₅₀ para las cepas seleccionadas a diferentes concentraciones de mezcla espora- cristal. Las LC₅₀ obtenidas representan los valores obtenidos de ensayos realizados por triplicado.

También realizamos un bioensayo de toxicidad con tres concentraciones de mezcla espora-cristal hacia larvas de mosquito *A. aegypti* (Díptero). Estos resultados son preliminares debido a que representan datos de mortalidad de un solo bioensayo realizado (Tabla 5).

Tabla 5.

Bioensayo contra *Aedes aegypti*.

Cepa	% de Mortalidad		
	100 ng/ cm ²	1 000 ng/ cm ²	10 000 ng/cm ²
4	0	0	0
24	5	45	80
101	0	0	0
121	0	0	5
135	0	0	0
Wt	20	70	85
Blanco	0		

Tabla 5: Resultados de bioensayo realizado contra larvas de tercer estadio de *Aedes aegypti*.

Según observamos en estos resultados preliminares de toxicidad, todas las cepas mutantes no tóxicas hacia larvas de *S. frugiperda* tampoco son tóxicas contra larvas de *A. aegypti*. Por el contrario, la cepa mutante 24 tiene una mortalidad mayor a la del resto de las toxinas mutantes y similar en comparación con la cepa silvestre. Estos datos preliminares nos muestran que el fenotipo no tóxico de las toxinas mutantes se conserva tanto en larvas de *S. frugiperda* como en larvas de *A. aegypti*.

Una vez analizada la toxicidad de estas cepas hacia *S. frugiperda* y *A. aegypti* se procedió a continuar los experimentos de caracterización de mutantes.

4.2 Solubilización de cristales.

La purificación de los cristales se realizó por gradiente discontinuo de sacarosa, como se detalla en materiales y métodos. En primer lugar se realizó la solubilización de las cepas elegidas con el fin de observar en gel de poliácridamida con SDS si las toxinas seleccionadas se solubilizan y cortan de manera similar a la cepa silvestre. El tamaño de la protoxina es de 135 kDa (fig. 10A y B).

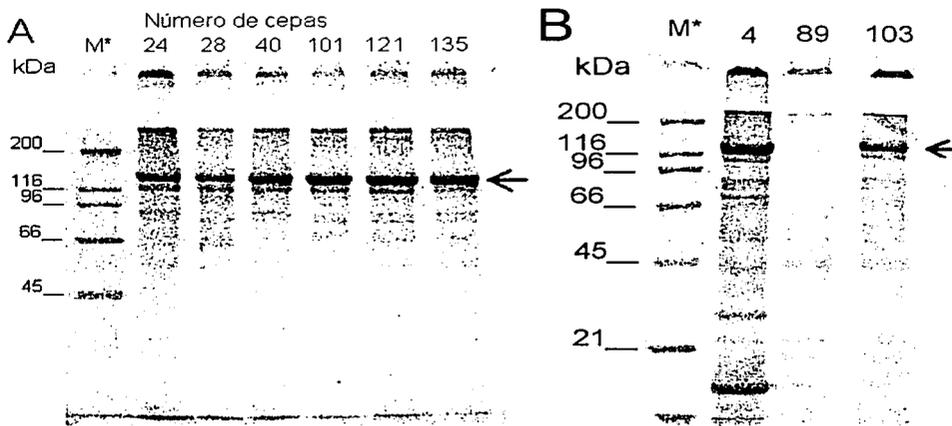


Fig.10. Gel de poliácridamida al 10% que muestra la banda correspondiente a la protoxina de las cepas mutantes. **A.** Protoxina de las cepas 24, 28, 40, 101, 121 y 135. **B.** Observamos la protoxina correspondiente a las cepas 4, 89 y 103. La cepa 89 no produce protoxina.

Como podemos observar en la Fig. 10A los cristales purificados de todas las cepas seleccionadas presentan una banda de 135 kDa la cual corresponde al tamaño de la protoxina. En cuanto a la Fig. 10B, las cepas 4 y 103 presentan la banda de 135 kDa correspondiente a la protoxina. La cepa 89 no produce protoxina.

4.3 Procesamiento de protoxina.

Como se menciona en la introducción se requiere de la activación de la protoxina para su correcto funcionamiento. La activación *in vitro* se lleva a cabo generalmente con tripsina. A concentraciones altas de tripsina, también se puede observar la degradación de la toxina debido a cortes adicionales en la secuencia de aminoácidos que resultan en la pérdida de toxicidad y en una disminución de la funcionalidad (Miranda *et al.*, 2001).

Posteriormente analizamos el procesamiento de la protoxina con tripsina a fin de observar si la toxina producida por estas cepas mutantes se procesa a un tamaño similar a la cepa silvestre. El tamaño de la toxina es de 65 kDa (Fig. 11).

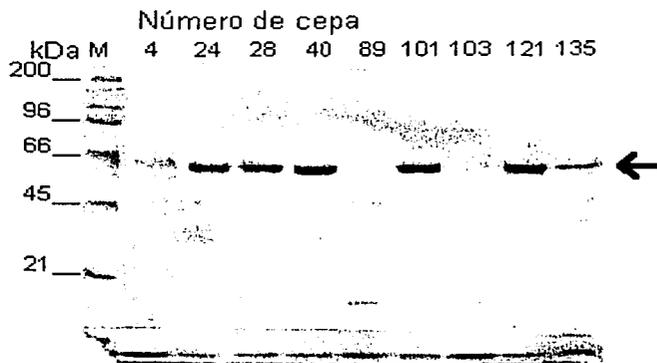


Fig.11. Gel de acrilamida que muestra la toxina de las cepas seleccionadas. La cepa 89 y 103 no muestran la banda esperada de 65 kDa. La banda correspondiente a la cepa 4 se observa de menor intensidad.

Como observamos en la figura 11, la cepa 89 no presenta la banda correspondiente al tamaño de la toxina, lo cual era de esperarse pues esta cepa no produce protoxina. En cuanto a la cepa 103, tampoco observamos una banda correspondiente a la toxina, la cual produce protoxina (Fig. 10B), lo cual sugiere que ésta se degrada durante el procesamiento con tripsina. La toxina mutante 4 presenta una banda de menor intensidad, lo cual nos dice que esta toxina no es tan estable al tratamiento con tripsina, en comparación con el resto de las toxinas mutantes y la toxina silvestre. Finalmente las mutantes 24, 28, 40, 101, 121 y 135 se procesaron para dar una banda de tamaño de 65 kDa, de manera similar a la cepa silvestre.

Posteriormente, realizamos un ensayo de cinética de digestión proteolítica con tripsina en las cepas seleccionadas a fin de determinar la estabilidad estructural de la toxina en el procesamiento con tripsina; para ello incubamos muestras de protoxina con diferentes concentraciones de tripsina por 1 hora a 37°C con agitación.

En la Fig. 12 se muestra la curva de tratamiento con tripsina de la cepa silvestre (Wt). El patrón de bandas obtenido para la cepa silvestre es una referencia para comparar el patrón obtenido de las toxinas mutantes.

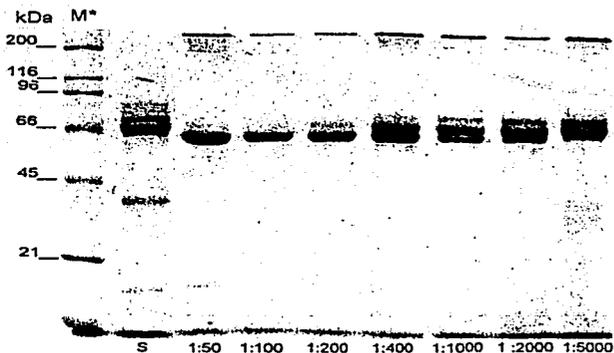


Fig.12. Patrón de bandas obtenido después del tratamiento con tripsina de la cepa silvestre. En la parte inferior se muestran las relaciones de tripsina/ proteína utilizadas. En la parte izquierda se muestra las diferentes bandas y tamaños del marcador utilizado (High, Biolabs. M*). S: protoxina de cepa silvestre.

El siguiente paso fue elaborar un ensayo de resistencia a tratamiento con tripsina para cada una de las cepas mutantes con el fin de comparar el patrón de corte para determinar si alguna mutante era sensible a tripsina. En la figura 13 se muestra la curva de resistencia a tripsina para cada una de las mutantes seleccionadas, las relaciones de tripsina/ proteína utilizadas fueron las siguientes: 1:20, 1:50, 1:200, 1:1000 (carriles 1- 4) e incluso 1:5000 para la cepa 103 (carriles 1- 5).

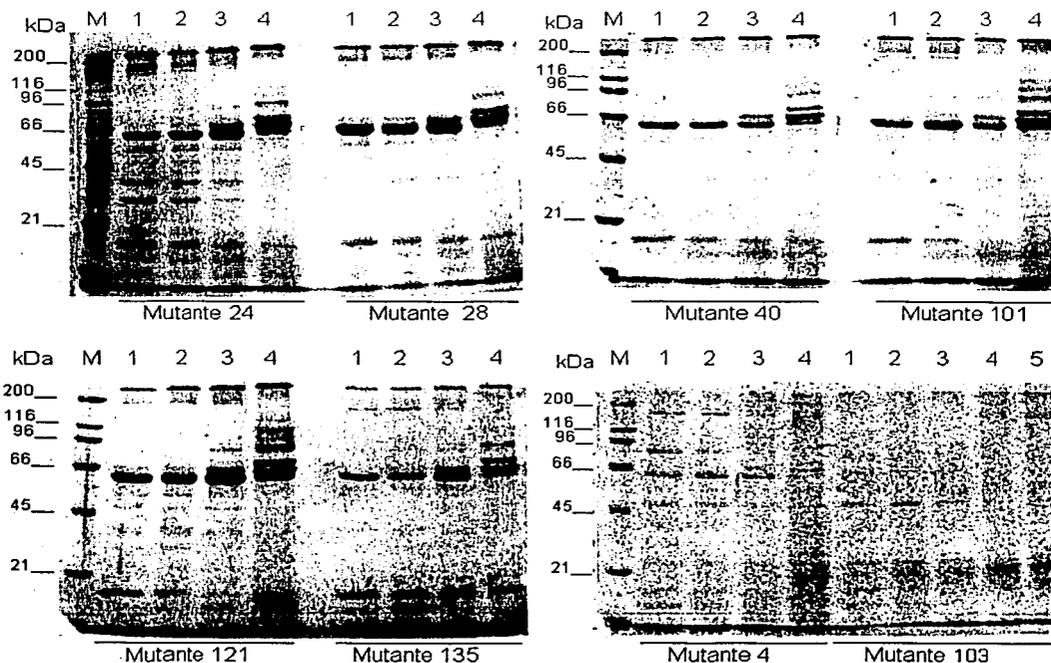


Fig. 13. Curva de resistencia a tratamiento con tripsina para cada una de las mutantes seleccionadas. Las relaciones de tripsina/ proteína utilizadas fueron: 1:20 (carril 1), 1:50 (carril 2), 1:200 (carril 3) y 1:1000 (carril 4); y en la cepa 103 1: 5000 (carril 5).

Como podemos observar en la Fig. 13, a excepción de la cepa 103, las toxinas mutantes seleccionadas presentan un patrón de corte similar a la toxina silvestre. Este resultado muestra que las toxinas mutantes presentan una sensibilidad similar al tratamiento con tripsina en comparación con la cepa silvestre. En cuanto a la cepa 103, observamos que aún a la menor concentración de tripsina adicionada la toxina se degrada por completo.

4.4 Localización de mutantes.

En todas las toxinas mutantes seleccionadas (4, 24, 89, 101, 103, 121, 135) se determinó la secuencia de nucleótidos del dominio II mediante secuenciación de doble cadena a fin de determinar los residuos de aminoácidos cambiados en las proteínas no tóxicas (4, 101, 103 y 121) en las cuales se observó producción, solubilización y susceptibilidad a tripsina de forma similar a la toxina silvestre. Incluso decidimos incluir a las toxinas 24, 89 y 103 en la determinación de secuencia para conocer las posibles mutaciones que nos dan por un lado un fenotipo acristalífero (cepa 89), un fenotipo sensible a tripsina (cepa 103) y finalmente una mutante con una toxicidad disminuida respecto a la toxina silvestre (cepa 24).

La localización de las mutaciones para cada una de las cepas mutantes se determinó mediante la alineación de la secuencia de aminoácidos de las cepas mutantes con la secuencia de aminoácidos del dominio II de la toxina Cry1Ca silvestre utilizando el programa GeneWorks®. La tabla 6 muestra las mutaciones obtenidas para cada una de las toxinas mutantes, las cuales indican mediante el número la mutación en la secuencia de aminoácidos y la naturaleza de la mutación.

Tabla 6.

Cambios de aminoácido en el dominio II de las toxinas mutantes.

Aa	Cepa 4	Cepa 24	Cepa 89	Cepa 101	Cepa 103	Cepa 121	Cepa 135	Localización
258					Pro→Phe			β-1a
268			Thr→Ala					β-1b
287					Phe→Leu		Phe→Leu	α-8b
301					Phe→Leu		Phe→Leu	β-2
309			Ile→Thr					β-2
319				Asn→Asp				β-3*, asa 1
320	Phe→Ser							β-3*, asa 1
327	Val→Ala							β-3
337					Ile→Gly		Ile→Gly	β-4
356	Phe→Leu							β-5
369				Leu→Phe				β-6*, asa 2
381						Phe→Ser		β-7r*, asa 2
387					Glu→Val		Glu→Val	β-7
392					Ser→Pro		Ser→Pro	β-7
393		Thr→Ala		Thr→Ala				β-7
407			Asp→Gly					β-9
408	Ser→Pro				Ser→Pro		Ser→Pro	β-9
415					Glu→Gly		Glu→Gly	β-9
443		Leu→Ser						β-11* asa 3
448			Val→Ala					β-11

Tabla 6. Se muestra la posición y naturaleza de las mutaciones para cada una de las toxinas mutantes así como su posición en la estructura secundaria dentro del dominio II. Las mutaciones indicadas con * se localizan cerca de las asas.

Con el fin de determinar la posición de las mutaciones obtenidas para cada una de las cepas mutantes en la estructura secundaria del dominio II, se realizó el modelamiento de la estructura de la toxina Cry1Ca (Fig.14) basándonos en la estructura de la toxina Cry1Aa. Cada una de las mutaciones presentes en las cepas mutantes (Tabla 6) se localizó en este modelo con el objeto de inferir si los cambios de aminoácidos se encuentran en la superficie de la proteína o se localizan en el interior de la toxina.

Los resultados de este análisis se describen a continuación para cada toxina mutante.

4.5 Modelo teórico de la toxina Cry1Ca.

Mediante el programa WU-Blast 2.0 determinamos la homología entre la secuencia de aminoácidos de las toxinas Cry1Aa y Cry1Ca. La identidad de secuencia entre las toxinas Cry1Aa y Cry1Ca es de 47%, con una similitud del 61%. A nivel de la secuencia de los tres dominios, las identidades entre ambas toxinas son: 56, 46 y 40%, para los dominios I, II y III, respectivamente.

El modelo teórico de la toxina Cry1Ca se realizó con la ayuda del Dr. Enrique Rudiño en el laboratorio de Estructura de Macromoléculas a cargo del Dr. Eduardo Horjales.

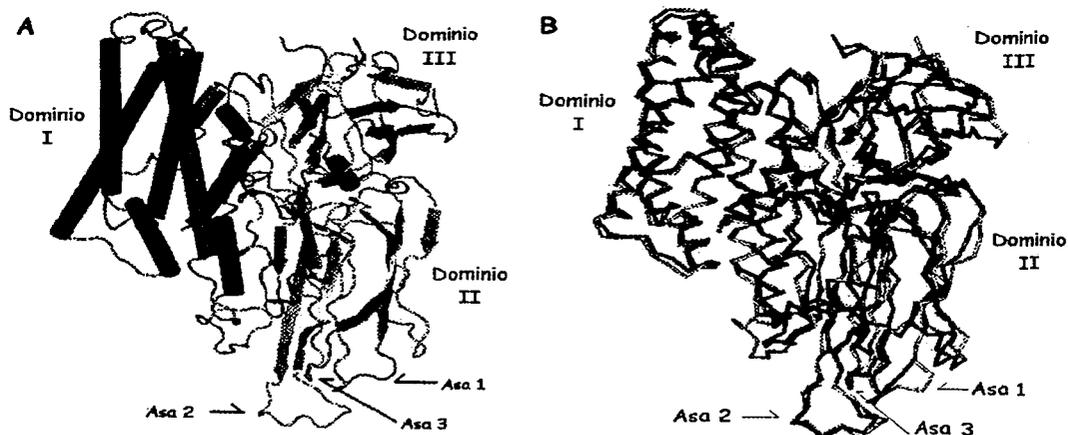


Fig. 14. A) Visualización de la toxina Cry1Ca en el programa VMD (Humphrey *et al.*, 1996). En color magenta se observan las α -hélices del dominio I (I) y en amarillo las hojas beta- plegadas del dominio II (II) y III (III). B) Empalme de las toxinas Cry1Aa (rojo) y Cry1Ca (gris). Todas las imágenes subsiguientes se visualizan con este programa.

La mutante 4 presenta cuatro mutaciones, dos de ellas: Phe320Ser y Phe356Leu estarían en la superficie de la toxina (Fig.15) en tanto que las mutaciones Ser408Pro y Val327Ala se localizarían dentro de la estructura de la toxina.

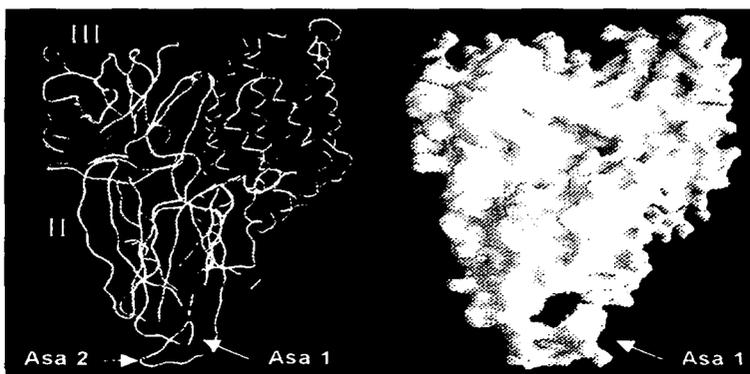


Fig.15. Modelo de la toxina mutante 4 de Cry1Ca. Visualización de la toxina mutante 4 en el programa GRASP (Nicholls *et al.*, 1993). Se observa en color rojo el aminoácido Phe320 (β 3) y en color amarillo el aminoácido Phe356 (β 5) ambos aminoácidos estarían en la superficie de la molécula. El aminoácido Ser408 (β 9) y Val327 (β 3) no estarían expuestos (no se muestran).

La mutante 24 presenta dos cambios. El aminoácido Thr393Ala se localizaría parcialmente expuesto hacia el solvente (fig.16), en la hoja β -7 de la toxina y Leu443Ser estaría expuesto al solvente y en una posición cercana al asa 3 formada por la hoja β 10 y β 11.

La mutante 89 presenta cuatro mutaciones: Thr268Ala, la cual se localiza en la hoja β 1b; Ile309Thr localizada en la hoja β 2; Asp407Gly localizada en la hoja β 9 y Val448Ala localizada en la hoja β 11.

La mutante 101 (Fig.16) presenta tres mutaciones en la secuencia de aminoácidos: Asn319Asp en la hoja β 3, Thr393Ala en la hoja β 7, los cuales estarían expuestos en la superficie de la toxina (o parcialmente expuestos) y Leu369Phe en la hoja β 6, el cual estaría dentro de la estructura de la toxina. El aminoácido Asn319 además se localiza en una región cercana al asa 1 formada por las hojas β 2 y β -3.

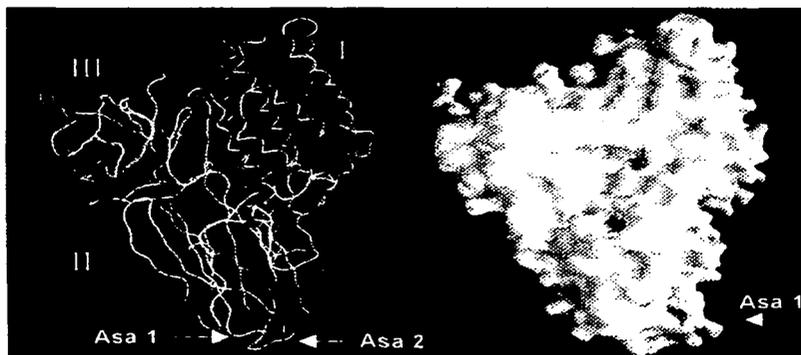


Fig. 16. Modelo de la toxina mutante 101 de Cry1Ca. En color magenta observamos el aminoácido Asn319 (β -3) y en color azul el aminoácido Thr393 (β -7), ambos aminoácidos estarían expuestos en la molécula. El aminoácido Leu369 (β -6) no estarían expuesto en la molécula (no se muestra).I, II y III; dominios I II y III, respectivamente.

La mutante 103 presenta ocho cambios en la secuencia de aminoácidos: Pro258Phe (β 1a), Phe287Leu (α -8b), Phe301Leu (β 2), Ile337Gly (β 4), Glu387Val (β 7), Ser392Pro (β 7), Ser408Pro (β 9*) y Glu415Gly (β 9). La mutante 135 presenta siete cambios similares a los de la cepa 103. La mutación Pro258Phe presente en la cepa 103 es la única diferencia entre ambas toxinas mutantes.

La mutante 121 presenta una sola mutación en la secuencia de aminoácidos: Phe381Ser (β 7) y que estaría expuesto (o parcialmente expuesto) hacia el solvente en la estructura de la toxina (Fig. 17).

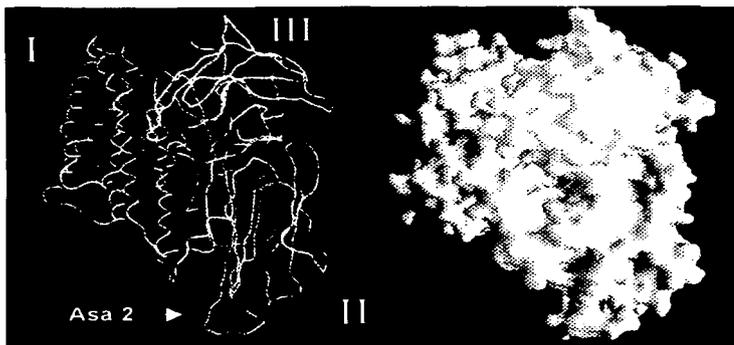


Fig.17. Modelo de la toxina mutante 121de Cry1Ca. Se observa en color verde el aminoácido Phe381 (β -r) el cual estaría expuesto en la molécula.

Para comparar nuestro modelo se analizó la localización y secuencia de aminoácidos de las asas 1, 2 y 3 en el Dominio II de las toxinas Cry1Aa y Cry1Ca reportadas por otros autores (Tabla 7).

Tabla 7.

Secuencia de aminoácidos de las asas 1, 2 y 3 en las toxinas Cry1Aa y Cry1C.

Cry1Aa	asa 1	asa 2	asa 3
Ref. I)	310 HRGF 313	367 RRIILGSGPNNQE 379	438 SQAAGAVYT 446
Cry1Ca	asa 1	asa 2	asa 3
Ref. II)	313WFSVGRNF320	371 LLQQPWPAPPF 381	437 RSGTPFLT 444
Ref. III)	317 GRNF 320	374 QPWP 377	436 QRSCTPF 442
Ref. IV)	317 GR 318	371 LLQQPWPAPP 380	436 QRSCTP 441

Tabla 7. Localización y secuencia de aminoácidos para las asas 1, 2 y 3 dentro del dominio II de las toxinas Cry1Aa y Cry1Ca reportadas por varios autores. Referencias: I) Grochulsky *et al.* (1995); II) Yamamoto y Dean, 2000; III) Smith y Ellar, 1994 y Abdul-Rauf y Ellar, 1999); IV) Secuencia de aminoácidos para las asas 1, 2 y 3 obtenidas en este trabajo mediante alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la toxina Cry1Ca y Cry1Aa.

De acuerdo con estos resultados, la secuencia de aminoácidos de las asas 1, 2 y 3 reportadas en este trabajo, se localizan en regiones similares (asas 2 y 3) o dentro de la secuencia (asa 1) reportadas por otros autores.

4.6 Marcaje de toxina con biotina (toxina*).

Para poder estudiar la unión de las toxinas mutantes a las membranas de células de intestinos de *S. frugiperda*. Las toxinas mutantes 4, 24, 101, 121 y 135, así como la cepa silvestre se marcaron con biotina. La toxina marcada se corrió en gel

de acrilamida y posteriormente se transfirió en nitrocelulosa para revelar con la enzima estreptavidina acoplada a peroxidasa como se detalla en materiales y métodos (Fig.18).

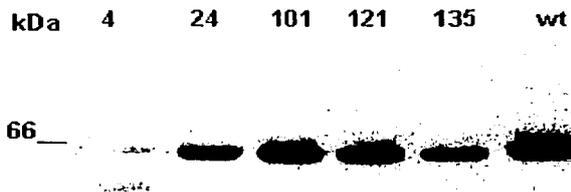


Fig.18. Placa de revelado en la cual observamos la señal correspondiente a la toxina biotinada para cada una de las mutantes y la toxina silvestre.

Una vez que observamos que la toxina se ha marcado debidamente con biotina determinamos concentración de toxina marcada por el método de Bradford y continuamos con los ensayos de unión de toxina* a vesículas de la microvellosidad apical de células de intestino medio de *S. frugiperda*. Observamos además que la toxina mutante 4 se marca adecuadamente aun cuando se procesa una menor cantidad de protoxina (Fig.18) pues observamos una banda de menor intensidad en comparación con el resto de las toxinas marcadas y además observamos otras bandas de menor tamaño al esperado como resultado de la degradación de esta toxina durante el proceso de corte con tripsina.

4.7 Ensayo de unión de toxina biotinada a VMVA.

En un trabajo realizado por Denolf *et al.* (1993) se determinó, mediante ensayos de competencia homóloga con toxina ^{125}I -Cry1Ab marcada radioactivamente y utilizando como competidor tanto toxina Cry1Ab nativa, como a la toxina marcada con biotina que la curva de desplazamiento es similar. Esto sugiere que la toxina biotinada se comporta como la toxina nativa, es decir, que la biotina que se une a la toxina no interfiere con la unión a su receptor en membrana. Al comparar los patrones de unión e intensidad de señal obtenidos mediante la detección de toxina biotinada y aquella detectada con anticuerpos se observan resultados similares. Finalmente, se observó mediante ensayos de competencia homóloga que un exceso de toxina Cry1Ab nativa desplaza completamente la señal de la toxina biotinada, concluyendo que la toxina Cry1Ab biotinada presenta unión específica y que la señal observada no se debe a pegado inespecífico de la toxina biotinada.

En este trabajo comprobamos que la toxina silvestre biotinada se une a las vesículas de la microvellosidad apical del insecto; para ello utilizamos 10nM de toxina* y 10 μg de vesículas de la microvellosidad apical de las células del intestino medio de *S. frugiperda* (Fig.19).

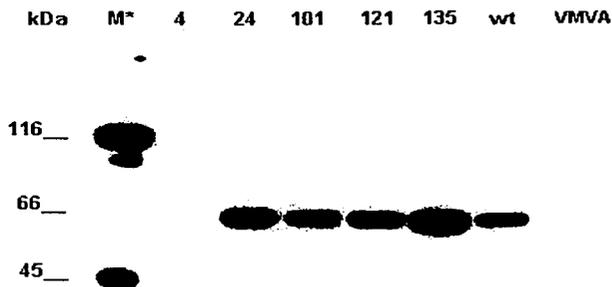


Fig.19. Se muestran las toxinas* mutantes 4, 24, 101, 121 y 135 así como la toxina* de la cepa silvestre (Wt) unidas a VMVA de *S. frugiperda*. Control: VMVA sin toxina silvestre biotinada.

De este ensayo podemos observar que la toxina mutante 4 no se une a las vesículas de *S. frugiperda*, incluso este resultado podría deberse a que la toxina mutante 4 se degrada completamente y por tanto no hay toxina que se una a las vesículas. El resto de las mutantes, así como la toxina silvestre si se unen a las vesículas de microvellosidad apical de *S. frugiperda*.

Para determinar si lo que observamos en la Fig.19 corresponde a una señal de unión o por el contrario se debe a precipitación de la toxina, elaboramos un experimento control en paralelo con todas las toxinas mutantes y la toxina silvestre, en el cual realizamos todo el proceso de unión y lavados pero sin adicionar vesículas. Por tanto si la toxina está en solución y el proceso de lavado no precipita a las toxinas, entonces no esperamos observar señal alguna en la placa de revelado pues la toxina* en solución se perdería en los lavados al desechar el sobrenadante.

Los resultados obtenidos en este ensayo de precipitación nos muestran que todas las toxinas mutantes se precipitan durante el proceso de lavado de la toxina biotinada. Por el contrario la cepa silvestre, aun a un largo tiempo de exposición no da señal, lo cual nos indica que la cepa silvestre se mantiene en solución por lo que se elimina perfectamente durante el proceso de lavado y por tanto no observamos la señal en la placa de revelado (Fig.20).

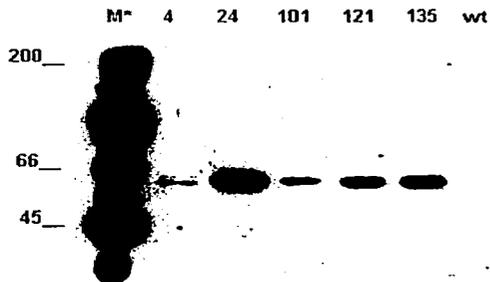


Fig.20. Ensayo de unión control con 30 nM de toxina* sin VMVA. Observamos que todas las toxinas mutantes precipitan durante el proceso de lavado. No observamos la señal correspondiente a la toxina silvestre (Wt) lo cual nos indicaría que esta toxina se mantiene en solución.

De este ensayo podemos concluir que la señal que se observa en el ensayo de unión (Fig.19) corresponde a la toxina* precipitada y que sólo la señal de la toxina silvestre se debe a la unión de esta toxina* a las VMVA de *S. frugiperda*. De acuerdo con este resultado la toxina mutante 4 no se uniría a las VMVA de *S. frugiperda*, ya que observamos la señal en el ensayo control (Fig.20).

4.8 Competencia homóloga.

Al realizar ensayos de competencia homóloga con la toxina silvestre marcada con biotina observamos que tenemos unión de la toxina* a VMVA de *S. frugiperda* a concentraciones de 5 nM (no se muestra) y 10 nM (carril 2, Fig.21). En cuanto al desplazamiento de la toxina* con toxina silvestre sin marcar, observamos que la señal se desplaza completamente a una concentración 100 veces mayor (100X) de competidor. El control negativo, en este caso, sólo VMVA, no da señal.

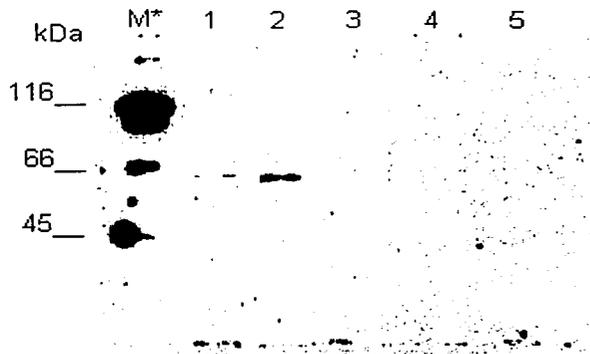


Fig.21. Competencia homóloga. M*: marcador de amplio intervalo biotinado, Carril 1: 10nM de toxina* silvestre, 2: 10 nM de toxina* + 10µg de VMVA de Sf., 3: 10µg de VMVA, 4 y 5: 100X y 1000X de toxina sin marcar, respectivamente.

Este resultado nos indica que la toxina* silvestre es desplazada completamente al adicionar "toxina fría" (Fig.21).

Con el fin de determinar de una forma cuantitativa la unión de la toxina Cry1Ca silvestre a VMVA de *S. frugiperda* se realizó el marcaje de la toxina con yodo 125 ($^{125}\text{I-Cry1Ca}$). Los ensayos de competencia heteróloga se realizaron con toxina marcada con yodo y las toxinas mutantes.

4.9 Marcaje radiactivo de la toxina Cry1Ca.

El marcaje de la toxina silvestre de Cry1Ca se realizó con yodo 125 (isótopo radiactivo) como se describe en materiales y métodos. Una vez que se marco a la toxina, la mezcla de reacción se pasa por una columna para separar el yodo libre de la toxina marcada. Se determinan las cuentas por minuto (cpm) de las diferentes fracciones obtenidas en un contador gamma. De los valores obtenidos determinados aquellas fracciones en las cuales se encuentra la toxina marcada (Fig.22).

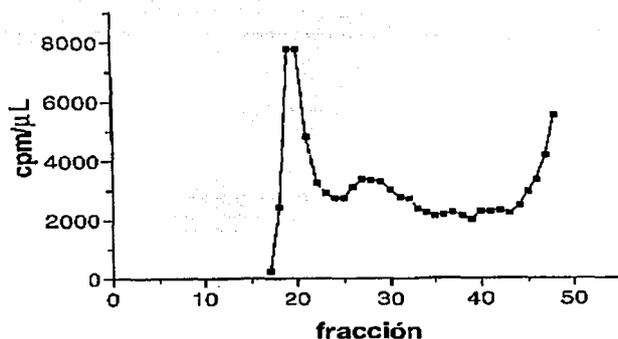


Fig.22. Fracciones obtenidas de la curva de elución de la toxina marcada con ^{125}I . Las primeras fracciones corresponden a la toxina marcada y las últimas al yodo no unido.

En la Fig.22 se observa el patrón de elución de las diferentes fracciones obtenidas. Observamos que la señal aumenta hasta un máximo en las primeras fracciones (fracciones 18-21), la cual correspondería a la toxina marcada. Posteriormente la señal disminuye y aquí tenemos una mezcla de toxina marcada y yodo libre. Finalmente la señal en las últimas fracciones corresponde al yodo libre que no se unió a la toxina.

Posteriormente realizamos un gel de acrilamida con 100 000 cpm/carril de las fracciones 18 a 28, que según la gráfica de elución de las fracciones obtenidas es donde esperamos tener a la toxina marcada (Fig.23).

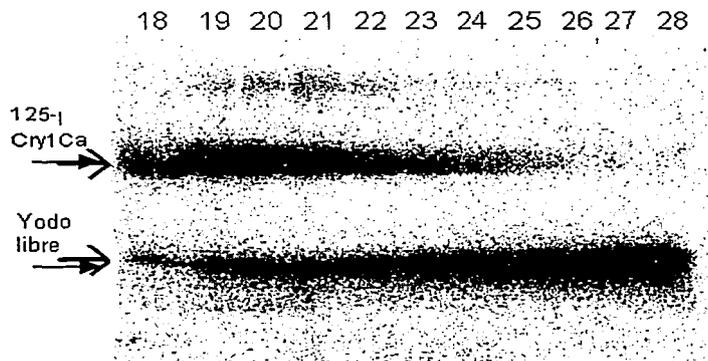


Fig.23. Gel de acrilamida al 10% con SDS con 100000 cpm/carril de las fracciones 18 a 28 obtenidas en el marcaje de la toxina.

Observamos que la toxina Cry1Ca marcada (Fig.23) se encuentra en prácticamente todas las fracciones elegidas y que la cantidad de yodo libre aumenta conforme la cantidad de toxina marcada disminuye. A partir de estos resultados podemos concluir que la toxina Cry1Ca se marca adecuadamente con ^{125}I .

Elegimos a la fracción 19 para realizar los ensayos de unión específica y tiempo óptimo de incubación de la toxina marcada a VMVA de *S. frugiperda*. En primer lugar realizamos ensayos de unión de toxina marcada con diferentes concentraciones (5, 10, 20 y 30µg) de VMVA de *S. frugiperda* con el fin de determinar la concentración óptima de vesículas a utilizar en los subsecuentes ensayos (Fig. 24).

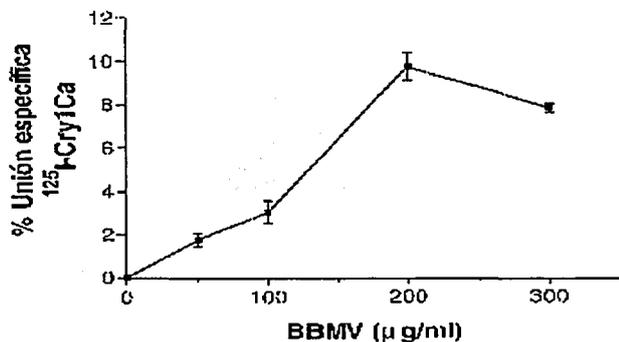


Fig.24. Unión de la toxina ¹²⁵I-Cry1Ca en función de la concentración de VMVA de *S. frugiperda*.

A partir de este resultado se tiene que el máximo de unión se obtiene a una concentración de 20 µg de vesículas (Fig.24), y debido a que este valor representa un umbral después del cual observamos que a mayor concentración de vesículas utilizadas la señal disminuye decidimos utilizar para el resto de los ensayos una concentración de 18 µg de vesículas. Posteriormente determinamos la unión de la toxina marcada con yodo en función del tiempo de incubación, para ello incubamos a la toxina marcada con 18 µg de vesículas a diferentes tiempos y determinamos la señal obtenida en el contador gamma (Fig.25).

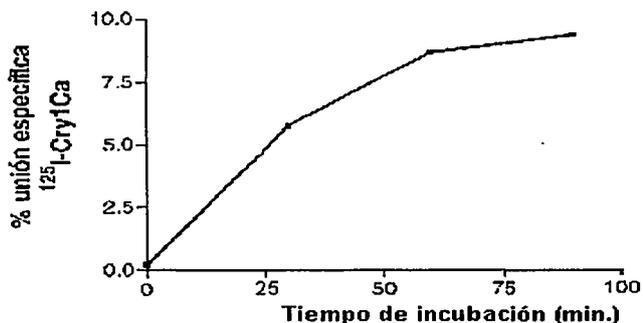


Fig.25. Unión de la toxina ¹²⁵I-Cry1Ca en función del tiempo de incubación con VMVA de *S. frugiperda*.

A partir de este resultado elegimos una concentración de 18 µg de vesículas, un tiempo de incubación de 60 min. para los ensayos de competencia homóloga y heteróloga.

En el ensayos de competencia homóloga utilizamos una concentración de toxina marcada correspondiente a 10000 cpm de la fracción 19. Para ello incubamos a la toxina marcada con diferentes concentraciones de toxina sin marcar en un volumen final de 100 μ L de reacción. La señal obtenida con un exceso de toxina sin marcar representa la unión inespecífica.

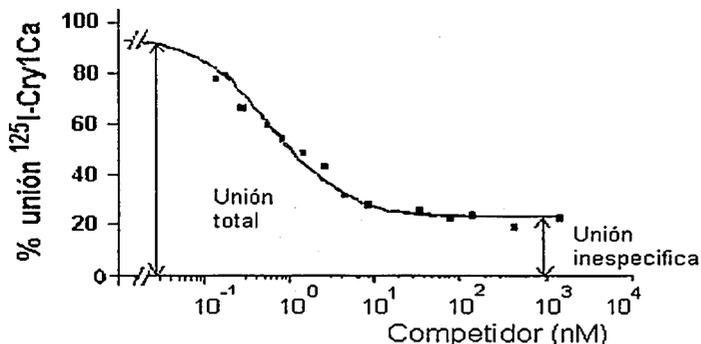


Fig.26. Desplazamiento de la señal de la toxina $^{125}\text{I-Cry1Ca}$ en función de la concentración de toxina no marcada (competencia homóloga).

Las concentraciones de toxina sin marcar utilizadas en el ensayo de competencia homóloga fueron las siguientes: 0, 1, 2, 4, 6, 10, 20, 50, 100, 250, 550, 1500, 3000 ng.

Finalmente realizamos ensayos de desplazamiento de la señal de la toxina silvestre marcada con diferentes concentraciones de toxinas mutantes sin marcar (competencia heteróloga). Estos resultados son preliminares pues solo de realizaron ensayo de competencia con dos toxinas mutantes: 121 y 135 (Fig.27).

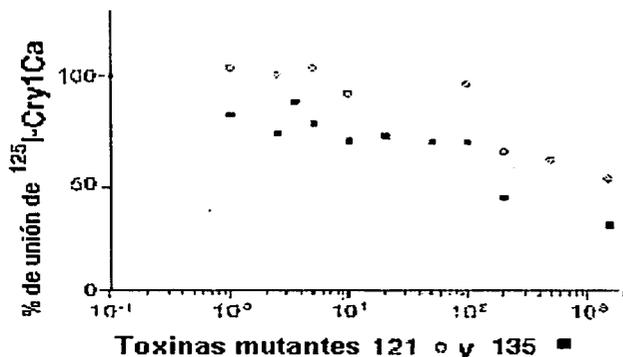


Fig. 27. Desplazamiento de la señal de la toxina silvestre marcada en función de la concentración de toxinas mutantes 121 y 135 no marcadas (competencia heteróloga).

En los ensayos de competencia heteróloga realizados, utilizamos las siguientes concentraciones: 0, 1, 2, 3.5, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, y 1500 ng de toxina sin marcar de las cepas mutantes 121 y 135.

5. Discusión.

De los resultados obtenidos mediante ensayos de toxicidad hacia larvas de insecto de *S. frugiperda* obtuvimos un total de 9 cepas mutantes con las cuales continuamos el trabajo de caracterización. Las cepas elegidas para el trabajo de caracterización comprenden cepas no tóxicas (4, 89, 101, 103, 121 y 135) así como cepas con actividad insecticida similar a la cepa silvestre (cepas 24, 28 y 40). Los ensayos de actividad insecticida se realizaron por triplicado para cada una de las toxinas mutantes, excluyendo a las cepas: 24, 28, 89 y 103.

La cepa 89 fue excluida como observamos en el gel de acrilamida de proteína soluble (protoxina) no hay presencia de protoxina (Fig. 10B en resultados), debido a que la cepa no produce cristal, lo cual confirmamos por observación en microscopio óptico. La cepa 103 fue excluida porque esta cepa produce cristal de forma similar a la cepa silvestre, pero como observamos en gel de acrilamida (Fig. 11 y 13, en resultados), la proteína no es resistente al tratamiento con tripsina, degradándose completamente. Las cepas 89 y 103 se incluyen como candidatas a secuenciarse a fin de conocer las posibles mutaciones que resultan en un fenotipo acristalífero (cepa 89) y en un fenotipo sensible a procesamiento con tripsina (cepa 103). Las cepas 28 y 40 se excluyeron de los ensayos de marcaje con biotina y unión a vesículas de la microvellosidad apical pues la actividad insecticida no es mayor a la de la cepa silvestre; siendo representativa de este grupo la cepa 24 con la cual si continuamos el trabajo de caracterización de mutantes.

De los bioensayos realizados con las cepas mutantes 4, 24, 101, 121, 135 y la cepa silvestre en larvas de mosquito *A. aegypti* (Tabla 5) los resultados obtenidos indican que la toxicidad de las cepas mutantes y la cepa silvestre presentan un perfil similar de toxicidad en ambos insectos. Es decir, las toxinas mutantes que no son tóxicas en larvas de *S. frugiperda* tampoco son tóxicas en larvas de *A. aegypti*. La toxina Cry1Ca es tóxica principalmente para el género *Spodoptera*, aunque también presenta actividad insecticida contra mosquitos; incluso se han determinado regiones dentro del dominio II (asas 2 y 3) responsables en la especificidad y toxicidad hacia ambos géneros de insectos (Abdul-Rauf, M. y Ellar, D.J., 1999). La diferencia de actividad de la toxina Cry1Ca en ambos géneros de insectos esta dada por la cantidad de toxina necesaria para obtener una dosis letal media. Mientras que la cepa silvestre presenta una dosis letal media (LC₅₀) de 80 ng/cm² la LC₅₀ en larvas de mosquito es de 490 ng/ml (resultado preliminar).

A partir de estos resultados podemos concluir que:

- La cepa 89 es acristalífera.
- Las toxinas 24, 28 y 40 presentan una toxicidad similar con respecto a la cepa silvestre.
- La toxina 103 es sensible a tripsina.
- Las toxinas 4, 102, 121 y 135 presentan toxicidad nula en larvas de *S. frugiperda* y *A. aegypti*.

Respecto al modelo teórico de la toxina Cry1Ca, los resultados mostrados en la tabla 6 nos muestran los cambios de aminoácido en el dominio II en cada una de las toxinas mutantes.

La toxina mutante 4 presenta cuatro mutaciones dentro del dominio II de los cuales los cambios de aminoácido Phe320Ser (β 3) y Phe356Leu (β 5) estarían localizados hacia el solvente, es decir, en la superficie de la toxina y los aminoácidos Ser408 (β 9) y Val327 (β 3) se localizarían dentro de la estructura de la toxina (fig.15). Además, de acuerdo con la secuencia de aminoácidos reportada para el asa 1 (Yamamoto *et al.*, 2000) y Smith y Ellar, 1994) el aminoácido Phe320 forma parte del asa 1 en el dominio II de la toxina Cry1Ca. Por el contrario, de acuerdo al alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de la toxina Cry1Aa y la toxina Cry1Ca realizado en este trabajo, el aminoácido Phe320 se encontraría en la vecindad del asa 1. Esto nos confirma la importancia de los aminoácidos presentes en las asas y en la vecindad de éstas como regiones de contacto importantes en la interacción entre la toxina y su receptor presente en la microvellosidad apical del intestino del insecto. Una mutación que pudiera ser muy importante en la estructura del dominio II de la toxina es Ser408Pro.

La toxina mutante 24 presenta dos cambios en la secuencia de aminoácidos: Thr393Ala (β 7) y Leu443Ser (β 11), de los cuales el aminoácido Thr393 se localizaría parcialmente expuesto en la estructura de la toxina y el aminoácido Leu443 estaría expuesto al solvente y en una posición cercana al asa 3 formada por la hoja β 10 y β -11. Esta mutante se comporta de manera similar a la toxina silvestre en cuanto a producción de proteína de cristal, solubilización y procesamiento; incluso la toxicidad es similar a aquella de la toxina silvestre. Esta toxina presenta una toxicidad similar a la toxina silvestre, sin embargo según resultados obtenidos esta toxina no sería estable en solución después de ser cortada con tripsina, ya que presenta precipitación. Podemos concluir que estos cambios de aminoácidos no afectarían drásticamente la toxicidad y que la inestabilidad de la toxina se debe a otros factores, quizá relacionados con el proceso de solubilización.

La toxina mutante 89 presenta cuatro mutaciones (Thr268Ala, Ile309Thr, Asp407Gly y Val448Ala) las cuales son suficientes para evitar la formación del cristal protéico. En principio no podemos descartar que esta cepa mutante no produzca proteína insecticida, pero sí podemos afirmar que estos cambios en la secuencia de aminoácidos son suficientes para que la toxina no se compacte como una inclusión cristalina, además, puesto que la toxina no se detecta en gel de acrilamida podemos inferir que, de producirse toxina insecticida, esta es sensible a las proteasas propias de la bacteria. Además, ninguna de las mutaciones se localiza en regiones cercanas o dentro de la secuencia de aminoácidos de las asas. Se especula que la formación del cristal protéico es una forma de proteger a la toxina de procesamiento proteolítico y que la formación del cristal dependería de una serie de factores como integridad de la estructura secundaria, puentes disulfuro y proteínas accesorias o chaperonas (Agaisse y

Lereclus, 1995). El hacer mutantes puntuales de los cambios de aminoácidos que presenta esta toxina mutante sería muy interesante para determinar si las mutaciones por separado permiten la formación del cristal proteico y si estas mutaciones estarían relacionadas con la nula toxicidad de esta cepa.

La toxina mutante 101 presenta tres mutaciones en la secuencia de aminoácidos: Asn319Asp (β 3), Thr393Ala (β 7) y Leu369Phe (β 6) de los cuales los aminoácidos Asn319 y Thr393 estarían expuestos (o parcialmente expuestos) al solvente mientras que el aminoácido Leu369 estaría dentro de la estructura de la toxina (Fig.16). El aminoácido Asn319 se localiza en la vecindad del asa 1 formada por las hojas β 2 y β -3 y el aminoácido Leu369 se encontraría en la vecindad del asa 2. En cuanto al aminoácido Thr393 tenemos que esta mutación se comparte con la cepa 24 la cual tiene una toxicidad similar a la cepa silvestre, por lo que podemos inferir que este cambio de aminoácido (Thr393Ala) probablemente no estaría involucrado en el fenotipo de actividad disminuida de esta mutante.

La toxina mutante 121 presenta una sola mutación en la secuencia de aminoácidos: Phe381Ser (β 7) y que además es un aminoácido que estaría expuesto (o parcialmente expuesto) hacia el solvente en la estructura de la toxina (Fig.17). Dado que la secuencia de aminoácidos para el asa 2 en el dominio II de la toxina Cry1Ca se determinó mediante alineamiento con la toxina Cry1Aa, este aminoácido no estaría dentro de la secuencia reportada para el asa 2 en la toxina Cry1Ca de acuerdo con Smith *et al.* (1994) y Abdul-Rauf *et al.* (1999). Según el modelo de la toxina Cry1Ca generado por Yamamoto *et al.* (2000) el aminoácido Phe381 sería parte del asa 2 dentro del dominio II de la toxina Cry1Ca (Tabla 7). En cuanto a la secuencia de aminoácidos para el asa 2 obtenida en este trabajo (₃₇₁LLQQPWPAPP₃₈₀) este aminoácido Phe381 se localizaría en la vecindad del asa 2 en la toxina Cry1Ca.

Este resultado nos confirma la importancia de los aminoácidos presentes en las asas o en la vecindad de éstas en la actividad tóxica de la toxina y dentro del mecanismo de acción de las toxinas insecticidas producidas por *B. thuringiensis*.

La toxina mutante 103 presenta ocho mutaciones y la mutante 135 siete mutaciones. Ambas toxinas mutantes comparten las mismas mutaciones y ambas no son tóxicas. La cepa 103 presenta una mutación extra: Pro258Phe y dado que esta mutante es sensible a corte proteolítico, a diferencia de la toxina mutante 135; podemos inferir que este cambio de aminoácido sería el responsable de la sensibilidad a procesamiento con tripsina. En ambas toxinas mutantes, la presencia de los cambios de aminoácidos Ser392Pro y Ser408Pro pudieran ser muy importantes en la estructuración del dominio II de la toxina Cry1Ca. Además la mutación Ser408Pro de ambas cepas también se encuentra en la toxina mutante 4, la cual tampoco es tóxica.

Para continuar con el trabajo de caracterización de mutantes marcamos a la toxina silvestre y toxinas mutantes con biotina, a fin de realizar ensayos de unión con vesículas de la microvellosidad apical de intestino medio de *S. frugiperda*.

Se ha demostrado que el marcaje con biotina de las toxinas Cry no afecta la unión a su receptor natural ni la actividad tóxica propia de las toxinas (Denolf *et al.*, 1993). En el presente trabajo durante el proceso de marcaje con biotina de las toxinas mutantes observamos que éstas se marcan adecuadamente y que el marcaje con biotina no provoca mayor procesamiento o inestabilidad de las toxinas mutantes, es decir, observamos una sola banda en la placa de revelado. Sin embargo la toxina mutante 4, la cual es sensible al procesamiento con tripsina, se degrada durante el proceso de marcaje casi por completo como observamos en la Fig. 18, la cual muestra que además de la banda esperada de 65 kDa, se generan una serie de bandas de menor peso molecular. De este resultado podemos inferir que la toxina mutante 4 no es completamente estable en comparación con la toxina silvestre. Por el contrario durante el procesamiento de la protoxina observamos que la cantidad obtenida de toxina mutante 4 activada con tripsina es menor en comparación con la toxina silvestre y resto de toxinas mutantes (Fig.11).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo de unión de toxina biotinada a VMVA de *S. frugiperda* (Fig. 19) observamos que la toxina silvestre marcada con biotina se une a las VMVA de intestino medio. Por el contrario, la señal que observamos en el experimento control (Fig. 20) corresponde a la toxina, de las diferentes toxinas mutantes marcadas con biotina, que se precipita durante el proceso de lavado.

A partir de estos resultados no podemos concluir si las toxinas mutantes están afectadas en unión a receptor debido a que los ensayos realizados con biotina son cualitativos. Incluso podemos inferir que hay cierta unión de las toxinas mutantes a VMVA pues en el ensayo control de unión (Fig. 20) la señal observada es menor a aquella del experimento de unión (Fig. 19). Esto podría interpretarse de la siguiente forma: en el ensayo de unión la señal que observamos corresponde tanto a la unión de toxina biotinada como de toxina precipitada durante el experimento. Por el contrario en el experimento control solo observamos la señal de la toxina* que precipita.

En el ensayo de competencia homóloga una concentración de toxina fría de 100X y 1000X con respecto a la concentración inicial de toxina marcada desplazan por completo la unión de la toxina silvestre biotinada (Fig. 21); se realizó una competencia a menor concentración de toxina fría y observamos que aun a menores concentraciones de competidor la señal correspondiente a la toxina silvestre marcada se desplaza completamente. Este resultado nos indica que la toxina silvestre marcada con biotina se une a las VMVA y que esta unión se desplaza fácilmente con una mínima concentración de competidor.

Un resultado constante obtenido a lo largo de los ensayos realizados con las diferentes toxinas mutantes y también con la toxina silvestre es la precipitación de las toxinas una vez que se procesan con tripsina. Se ha demostrado que las toxinas procesadas *in vitro* con tripsina pueden coexistir como mezclas de monómeros y agregados moleculares con un tamaño mayor a los 600 kDa (Güereca and Bravo, 1999) y que la agregación de dichas toxinas es dependiente del tiempo a partir de que la toxina se procesa *in vitro*. En los experimentos realizados en este trabajo observamos que todas las cepas mutantes presentaban precipitación muy rápidamente después de ser procesadas con tripsina.

Aunque también en la toxina silvestre se observó precipitación, se determinó un protocolo de activación con tripsina *in vitro* en el cual se mantenía a la toxina silvestre soluble por un periodo de tiempo mayor. Se ha reportado que las toxinas de *B. thuringiensis* activadas *in vitro* con tripsina presentan precipitación (Masson *et al.*, 2001; Güereca, L. y Bravo, A., 1999), encontrándose agregados moleculares de alto peso molecular. Por tanto, realizamos un ensayo de competencia homóloga a dos concentraciones de toxina silvestre sin marcar (competidor) y una concentración determinada de toxina silvestre biotinada.

En un trabajo realizado por Masson *et al.* (2001) se investigó el efecto del pH, composición del regulador (CAPS 50mM, pH 11; solución de carbonatos 40mM, pH 10.5; amortiguador HEPES 10mM, pH 7.2) y cantidad de sal o fuerza iónica (0, 50, 150 y 400mM de NaCl) como determinantes de la solubilidad de las toxinas Cry1Ca y Cry1Ab. De acuerdo con los resultados reportados ninguno de los parámetros antes mencionados afecta en particular la solubilidad de la toxina Cry1Ca y más del 95 % del total de la toxina se mantiene en forma de monómeros solubles, por el contrario la toxina Cry1Ab se precipitaba cuando se bajaba la fuerza iónica. En este trabajo probamos diferentes concentraciones de sal (fuerza iónica) así como de pH (7.2, 8.6 y 10.5); incluso realizamos purificación de las toxinas procesadas con tripsina por cromatografía de intercambio iónico (FPLC) y en todos los resultados obtenidos las toxinas presentaban precipitación. Finalmente encontramos que la concentración inicial de protoxina que se procesaba con tripsina y el volumen final de la reacción eran importantes en la solubilidad de la toxina Cry1Ca. Con este protocolo las toxinas se mantenían un mayor tiempo solubles, pero de cualquier forma no permanecían en solución indefinidamente. La conclusión de este resultado es que las toxinas mutantes no se mantienen estables después de ser activadas *in vitro*.

Finalmente realizamos marcaje radiactivo de la toxina Cry1Ca con yodo 125 a fin de determinar cuantitativamente la unión de las toxinas mutantes a VMVA de *S. frugiperda*. Los resultados obtenidos en el marcaje de la toxina Cry1Ca con ¹²⁵I indican que la toxina silvestre se marca correctamente. En el ensayo de competencia homóloga, la toxina silvestre sin marcar desplaza la señal de la toxina marcada, lo cual indica que esta unión es específica y por lo tanto se desplaza correctamente al adicionar toxina fría. A partir de los resultados del ensayo de competencia homóloga se determinará la afinidad de la unión de la toxina por las VMVA (K_d).

En el ensayo de competencia heteróloga realizado con las toxinas mutantes 121 y 135, observamos que estas toxinas mutantes no desplazan la señal de la toxina marcada de forma similar a la toxina silvestre. Por lo tanto se requeriría una mayor concentración de toxina mutante para desplazar completamente la señal de la toxina silvestre. Estos resultados preliminares indicarían que las toxinas mutantes 121 y 135 están afectadas en la unión a VMVA de *S. frugiperda*, lo cual explica por que estas toxinas no son tóxicas en los bioensayos realizados.

6. Perspectivas.

Las perspectivas de este trabajo son las siguientes:

6.1 Análisis de Unión.

Una de las perspectivas de este trabajo es el estudio detallado y cuantitativo del resto de las toxinas mutantes (toxinas 4, 24 y 101) en la unión a receptor de VMVA de *S. frugiperda*. Para tal fin podemos hacer uso de diferentes herramientas como son:

6.1a. Surface Plasmon Resonance (SPR). La técnica de "surface plasmon resonance" es una herramienta que permite medir interacciones de moléculas biológicas, por ejemplo: interacción proteína-proteína, búsqueda de nuevos ligandos, mapeo de epitopes, determinación de constantes de afinidad y determinación de cinéticas de unión. Esta técnica presenta dos grandes ventajas sobre otros métodos para determinar interacción entre moléculas biológicas: 1) Permite determinar la interacción cinética de dos biomoléculas en tiempo real con una alta sensibilidad y 2) No se necesita ningún tipo de marcaje de las moléculas para su detección. El sistema determina la interacción midiendo la concentración de masa de las biomoléculas cercanas a una superficie.

6.2. Elaboración de mutantes puntuales del dominio II de la toxina Cry1Ca.

Con el fin de ubicar a detalle el aminoácido o aminoácidos responsables del fenotipo de cada una de las mutantes obtenidas, una de las perspectivas de este trabajo es la realización de mutantes puntuales para cada uno de los cambios de aminoácido de interés obtenidos (tabla 6) en el dominio II de las toxinas mutantes.

Podemos inferir que una mutación dentro de la estructura del dominio II pudiera afectar el plegamiento de la estructura secundaria y repercutir en el funcionamiento de la toxina. También podemos inferir que una mutación en la superficie del dominio II pudiera no alterar la estructura tridimensional de la toxina, pero ser muy importante en la unión a receptor. Para ello elegimos a las cepas 4, 24, 101 y 135 para elaborar mutantes puntuales con los cambios de aminoácidos obtenidos. La mutante 121 cuenta únicamente con una sola mutación por lo que este único cambio sería el responsable de su fenotipo no tóxico hacia larvas de *S. frugiperda*.

También sería interesante realizar mutaciones puntuales de la cepa 89, ya que esta cepa cuenta con solo cuatro mutaciones dentro del dominio II, ninguna de las cuales se encuentra en regiones cercanas a las asas. A partir de las mutantes puntuales en esta toxina podríamos determinar si alguno de los cambios de aminoácidos está directamente relacionado con la formación del cristal de protoxina.

En cuanto a las cepas 103 y 135 tenemos que el número de mutaciones es similar, siendo ambas mutantes no tóxicas y además la mutante 103, con una

mutación adicional, es sensible a tripsina. En este sentido la cepa 135 es muy interesante para realizar mutantes puntuales debido a que ninguno de los cambios de aminoácido se encuentra en las regiones de las asas. Además esta toxina se produce en una inclusión cristalina y se procesa con tripsina de forma similar a la cepa silvestre. Incluso podemos inferir que los cambios de aminoácido Ser392Pro y Ser408Pro no serían determinantes en la estructuración de la protoxina en el cristal proteico y que tampoco confieren una mayor sensibilidad al tratamiento con tripsina. Por el contrario estos aminoácidos pudieran ser muy relevantes en la interacción de la toxina con su receptor natural y por tanto verse afectada la toxicidad de esta toxina mutante.

Una idea interesante sería introducir estas mutaciones en el gen de la toxina Cry1Ca del Dr. Luke Masson (Masson *et al.*, 2001) ya que su toxina activada no se precipita y nos permitiría tener mejores condiciones para el estudio de las toxinas mutantes puntuales a realizarse.

Las cepas con las mutaciones puntuales obtenidas se probarán mediante ensayos de toxicidad hacia larvas de *Spodoptera frugiperda*.

6.3. Mutagenesis aleatoria del dominio III de la toxina Cry1Ca.

Debido a que el dominio III de la toxina Cry1Ca puede funcionar como un determinante en la especificidad hacia *Spodoptera exigua* independientemente del origen de los dominios I y II e incluso toxinas híbridas con este dominio III de Cry1Ca presentan una mayor toxicidad (de Maagd *et al.*, 2000), una perspectiva interesante es la elaboración de mutantes en el dominio III de la toxina Cry1Ca mediante un acercamiento experimental similar a aquel del Dr. Didier Lereclus en la elaboración de las mutantes aleatorias en el dominio II de esta toxina.

Literatura citada.

Abdul-Rauf, M., and Ellar, D.J. 1999. Mutations of Loop 2 and Loop 3 Residues in Domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1C δ -Endotoxin Affect Insecticidal Specificity and initial Binding to *Spodoptera littoralis* and *Aedes aegypti* Midgut Membranes. *Current Microbiology*. 39: 94-98.

Agaisse, H. and Lereclus, D. 1995. How Does *Bacillus thuringiensis* Produce So Much Insecticidal Crystal Protein?. *Journal of Bacteriology*. 177 (21): 6027-6032.

Aranda, E., Sánchez, J., Peferoen, M., Güereca, L., and Bravo, A. 1996. Interactions of *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins with Midgut Epithelial Cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 68: 203-212.

Aronson, A.I., Geng, C., and Wu, L. 1999. Agregation of *Bacillus thuringiensis* Cry1A Toxins upon Binding to Target Insect Larval Midgut Vesicles. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol.6, No.6: 2503-2507.

Aronson, A. I., and Shai, Y. 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiology Letters* 195: 1- 8.

Baum, J. A. and Malvar, T. 1995. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Micro Review*. *Molecular Microbiology*. 18 (1): 1-12.

Bravo, A. y Soberón, M. 2000. *Microbios en línea*. Coordinación de la Investigación científica, UNAM. Martínez, R. E. y Martínez, R. J. (editores).

Bravo, A., Sanchez, J. Kouskoura, T., and Crickmore, N. 2002. N-termial activation is an essential early step in the mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (27):23985-23987.

Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., Delano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, j., Nilges, N., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. & Warren, G.L. (1998). Crystallography and NMR system (CNS): a new software system for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.* D54: 905-921.

Burton, S.L., Ellar, D.J., Li, J., and Derbyshire, D.J. 1999. N-Acetylgalactosamina 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, L. J., and Ellar, D.J. 1991. Crystal Structure of Insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353: 815-821.

Damgaard, Per Hyldebrink. 1996. Environmental Aspects of the Bacterial Insect Pathogen *Bacillus thuringiensis*. Ph. D. Thesis. Department of Ecology and Molecular Biology. The Royal Veterinary and Agricultural University Copenhagen, Denmark.

Dean, D.H., Rajamohan, F., Lee, M.K., S.-J. Wu., Chen, X.J., Alcantara, E., Hussain, S.R. 1996. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis – a minireview. *Gene* 179: 111-117.

de Maagd, R. A., Kwa, M. S. G., M. S. G. Der Klei, M. S. G., Yamamoto, Y. Schipper, B., Vlak, J. M., Stiekema, W. J., and Bosch, D. 1996. Domain III Substitution in *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin Cry1Ab Results in Superior Toxicity for *Spodoptera exigua* and Altered Membrane Protein Recognition. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (5): 1537-1543.

de Maagd, R. A., Weemen-Hendriks, M., Stiekema, W., and Bosch, D. 2000. *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin Cry1C Domain III can Function as a Specificity Determinant for *Spodoptera exigua* in Different, but No All, Cry1-Cry1C Hybrids. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (4): 1559-1563.

de Maagd, R. A., Bravo, A. and Crickmore, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *TRENDS in Genetics* 17 (4) April 2001.

Denolf, P., Jansens, S., Houdt, S.V., Peferoen, M., Degheele, D., and Van, R. J. 1993. Biotinylation of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (6): 1821-1827.

Derbyshire, D.J., Ellar, D. J. and Li, J. 2001. Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine. *Acta crystallographica section D*, 1938-1944.

Estruch, J. J., Warren, W. G., Mullins, A. M., Nye, J. G., Craig, A. J., and Koziel, G. M. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 5389-5394.

Flores, H., Soberón, X., Sánchez, J., Bravo, A. 1997. Insolated domain II y III from the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin binds to lepidopteran midgut membranes. *FEBS Letters* 414: 313-318.

Gazit, E., La Rocca, P., Sansom, M.S.P., and Shai, Y. 1998. The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 12289-12294.

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

Grochulsky, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.L., Brousseau, R., and Cygler, M. 1995. *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) toxin: Crystal Structure and Channel Formation. J. Mol. Biology. 254: 447-464.

Güereca, I., and Bravo, A. 1999. The oligomeric state of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in solution. Biochimica et Biophysica Acta. 1429: 342- 350.

Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics", J. Molec. Graphics, 1996, vol. 14, pp. 33-38.

Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved Methods for building protein models in electron density maps and the location of Errors in electron density maps and the location of errors in these models. Acta Cryst. A 47: 110-119.

Kyong, M. L., Young, B. A., and Dean, D. H. 1995. Domain Exchanges of *Bacillus thuringiensis* Cry1A Toxins Affect Binding to Different Gypsy Moth Midgut Receptors. Biochemical and Biophysical Research Communications. 216 (1): 306-312.

Lereclus, D., Agaisse, H., Grandvalet, C., Salamitou, S., Gominet, M. 2000. Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. Int. J. Med. Microbiology. 290: 295-299.

Lorence, A., Darzon, A., Díaz, C., Lievano, A., Qintero, R., Bravo, A. 1995. δ -Endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. FEBS Letters. 360:217- 222.

Lorence, A., Darzon, A., and Bravo, A. 1997a. Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes. FEBS Letters. 414: 303-307.

Lorence Quiñones Argelia. 1997b. Análisis de la Actividad de Formación de Poro de las Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* en presencia de su Receptor Nativo. Tesis Profesional de Doctorado. Instituto de Biotecnología. UNAM. 87 pp.

Luo, K., Lu, Y. J. Adang, M. J. 1996. A 106 kDa form of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1C δ -endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. and Molecular Biology*. 26 (8-9): 783-791.

Martínez-Ramírez, A. C. González-Nebauer, S., Escriche, B. and Real M. D. 1994. Ligand blot Identification of a *Manduca sexta* midgut binding protein specific to three *Bacillus thuringiensis* Cry1A-type ICPs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 201: 782-787.

Masson, L., Tabashnik, B.E.Y., Liu, B., Bruosseau, R., and Schwatz, J.L. 1999. Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa Toxin Lines the Lumen of the Ion Channel. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 31996-32000.

Masson, L., Mazza, A., Sangadala, S., Adang, M. J., and Brosseau, R. 2001. Polydispersity of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins is solution and its effect on receptor binding kinetics. *Biochimica et Biophysica Acta*. 36536: 1- 11.

Meza Romero Roberto. 1997. Mutagenesis sitio-dirigida de una región hidrofóbica de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* spp *berliner*. Tesis Profesional de Doctorado. Instituto de Biotecnología. UNAM. 65 pp.

Miranda, R., Zamudio, F.Z., Bravo, A. 2001. Processing of Cry1Ab δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31: 1155- 1163.

Mount, D. W. *Bioinformatics. Sequence and genomic analysis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, Nueva York, USA.

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 Cry1Aa toxin. *FEBS Letters*. 460: 385- 390.

Nicholls, A., Bharadwaj, R. & Honig, B. (1993). GRASP – graphical representation and analysis of surface properties. *Biophys. J*. 64: A166.

Pietrantonio, P.V., and Gill. S.S. 1996. *Bacillus thuringiensis* endotoxins: action on the insect midgut. *Biology of the Insect Midgut*. Lehane, M.J., y P.F. Billingsley (editores). Chapman & Hall, Londres. pp. 345-372.

Rajamohan F., Kyong, M.L. and Dean H.D. 1998. *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins: Molecular Mode of Action. Review. *Progress in Nucleic Acid Res. Mol. Biol*. 60: 1- 27.

Sanchis, V., and Ellar, D. J. 1993. Identification and partial purification of a *Bacillus thuringiensis* Cry1C δ -endotoxin binding protein from *Spodoptera littoralis* gut membranes. *FEBS* 316 (3): 264- 268.

Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler, and D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62 (3): 775-806.

Schwartz, J-L., Juteau, M., Grochulski, P., Cygler, M., Préfontaine, G., Brousseau, R., and Masson, L. 1997. Restriction of Intramolecular Movements within the Cry1Aa toxin Molecule of *Bacillus thuringiensis* Through Disulfide Bond Engineering. *FEBS Letters* 410: 397-402.

Soberón, M., Pérez, R.V., Nuñez-Valdéz, 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 Microbiology Letters*. 191: 221-225.

Smith, G.P., and Ellar, D.J. 1994. Mutagenesis of two surface-exposed loops of the *Bacillus thuringiensis* Cry1C δ -endotoxin affects insecticidal specificity. *Biochem. J*. 302: 611- 616.

Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, I., Ji, T., and Bulla, Jr. L. 1995. Cloning and Expression of a Receptor for an Insecticidal Toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem*. 270: 5490-5494.

Wolfersberger, M., Luethy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, F.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.

Yamamoto, T. and Dean, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. Chapter 2.2. Charles, J.F., Delécluse, A. and Nielsen-LeRoux, C. (editores). 2000. *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Kluwer Academic publishers. The Netherlands. Pp 81-100.