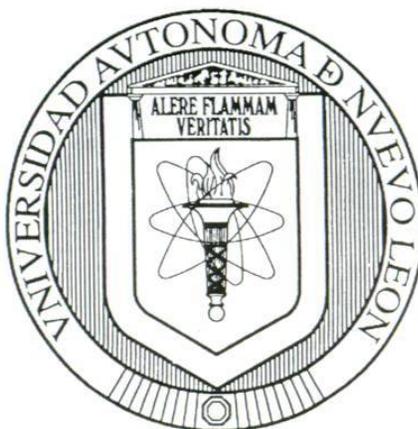


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**MECANISMO DE ACCION MOLECULAR DE LA
 δ -ENDOTOXINA DE *Bacillus thuringiensis***

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA
PRESENTA:**

Q.B.P. LUIS CASTULO DAMAS BUENROSTRO

MONTERREY, N.L., MEXICO

DICIEMBRE 1998

TM

QR8

.B3

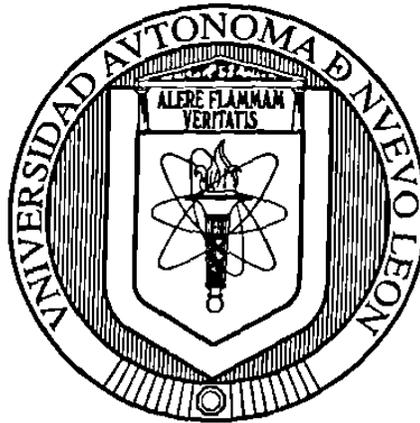
D3

C.1



1080087108

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**MECANISMO DE ACCION MOLECULAR DE LA
 δ -ENDOTOXINA DE *Bacillus thuringiensis***

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA
PRESENTA:**

Q.B.P. LUIS CASTULO DAMAS BUENROSTRÓ

MONTERREY, N.L., MEXICO

DICIEMBRE 1998

TM
9282
.B3
D3



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**MECANISMO DE ACCION MOLECULAR DE LA
 δ -ENDOTOXINA DE *Bacillus thuringiensis***

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA
PRESENTA:**

Q.B.P. LUIS CASTULO DAMAS BUENROSTRO

APROBADA

COMISION DE TESIS

DR. BENITO PEREYRA ALFEREZ

Director

DR. CARLOS EDUARDO HERNANDEZ LUNA

Secretario

M.C. JUAN FRANCISCO CONTRERAS CORDERO

Vocal

MONTERREY, N.L., MEXICO

DICIEMBRE 1998

DEDICATORIA

A DIOS. por ser el Creador y Redentor del universo.

A MI PADRE. Sr. Cástulo Damas Villanueva : por ese amor paterno que se constituye en el punto de apoyo en el cual he podido fincar lo que soy.

A MI MADRE. Sra. Maria Eulogia Buenrostro de Damas(†) : porque aún en tu ausencia sigo recibiendo de ti las lecciones más valiosas de mi vida.

A MI ESPOSA. Elda Ramos de Damas : porque eres el ser que inspira en mí los más hermosos sentimientos y pensamientos.

A MI HIJO. Luis Calet Damas Ramos : porque eres tan pequeño, pero sin saberlo haces cosas tan grandes en mí.

A MIS HERMANOS. Julio Domingo y Gabriela Damas Buenrostro : en quienes tengo los mejores amigos del mundo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Benito Pereyra Alférez, por dirigir con agudeza este trabajo y sobre todo porque más que asesor lo considero mi amigo.

Al Dr. Carlos E. Hernández Luna y M.C. Juan F. Contreras Cordero, por la revisión de este trabajo y de quienes recibí sinceras muestras de amistad.

A mis compañeros del laboratorio de Genética y Biología Molecular de Microorganismos (por orden alfabético) : Alberto, Alma, Carlos, Erasmo, Ernesto, Ismael, Ivett, Jesús, Magda, Myriam Angélica, Myriam Esther, René y Zacarías, por haber enriquecido mi estancia en el laboratorio con su compañía.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L., en especial al Dr. Luis J. Galán Wong, Jefe del Departamento, por haberme concedido las facilidades para realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca de estudios que me permitió alcanzar esta meta.

A todas las personas que directa o indirectamente contribuyeron a la realización de este trabajo.

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE MICROORGANISMOS DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS DE LA U.A.N.L. BAJO LA DIRECCION DEL DOCTOR BENITO PEREYRA ALFEREZ

INDICE

| | Página |
|---|---------------|
| Lista de Abreviaturas | 1 |
| Indice de Figuras y Tablas | 2 |
| Resumen | 3 |
| Introducción | 4 |
| Hipótesis y Objetivos | 6 |
| Antecedentes | |
| La familia de proteínas Cry | 7 |
| Modo de acción de las δ -endotoxinas | 10 |
| Estructura de las δ -endotoxinas | 14 |
| Materiales y Métodos | |
| Cepas bacterianas y plásmidos | 18 |
| Delimitación de los dominios de <i>cry1Ac1</i> y diseño de oligonucleótidos | 18 |
| Mutagénesis dirigida al sitio de <i>cry1Ac1</i> y <i>cry3Aa1</i> | 21 |
| Subclonación del dominio I | 22 |
| Reconstrucción de los genes nativos | 23 |
| Construcción y clonación de los genes quiméricos | 25 |
| Subclonación de las quimeras de <i>Cry1Ac1</i> y <i>Cry3Aa1</i> en Bt | 26 |
| Análisis de la expresión de los genes mutantes | 27 |
| Bioensayos con <i>T. ni</i> | 28 |
| Resultados | |
| Mutagénesis dirigida al sitio | 29 |
| Reconstrucción de los genes nativos y generación de genes quiméricos | 30 |
| Subclonación de los genes quiméricos en Bt | 32 |
| Análisis de la expresión de los genes quiméricos | 33 |
| Actividad biológica de las toxinas quiméricas | 35 |
| Discusión | |
| Delimitación de los dominios estructurales | 36 |
| Intercambio de los dominios | 37 |
| Expresión de los genes quiméricos | 38 |
| Participación de los dominios en la actividad insecticida | 40 |
| Conclusiones | 44 |
| Literatura Citada | 45 |
| Apéndices | |
| A. Diseño de las construcciones genéticas | 58 |
| B. Mapas de restricción | 60 |
| C. Medios de Cultivo y Soluciones | 61 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|-----------------------------------|
| ADN | Acido desoxirribonucleico |
| ARN | Acido ribonucleico |
| Bt | <i>Bacillus thuringiensis</i> |
| °C | Grados celsius |
| cm | Centimetro |
| dNTPs | Desoxirribonucleótidos trifosfato |
| Ec | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Acido etilen-diamino-tetraacético |
| <i>et al.</i> | Y colaboradores |
| g | Gramo |
| h | Hora |
| kDa | Kilodaltones |
| kpb | Kilopares de bases |
| kV | Kilovoltios |
| l | Litro |
| lb/pulg ² | libras por pulgada cuadrada |
| M | Molar |
| mM | Milimolar |
| mA | Miliamperes |
| mg | Miligramo |
| mm | Milimetro |
| ml | Mililitro |
| μF | Microfaradios |
| μg | Microgramo |
| μl | Microlitro |
| ng | Nanogramo |
| nt | Nucleótido |
| Ω | Ohms |
| pb | Pares de bases |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| PM | Peso molecular |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| seg | Segundo |
| subsp | Subespecie |
| T. ni | <i>Trichoplusia ni</i> |
| U | Unidades enzimáticas |
| V | Voltios |

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

| Figuras | | Página |
|----------------|--|---------------|
| 1 | Estructura tridimensional de Cry3Aa1 | 17 |
| 2 | Electroforesis de agarosa de los productos amplificados por PCR | 29 |
| 3 | Análisis de restricción de los genes reconstruidos y quiméricos | 31 |
| 4 | Análisis de restricción de los plásmidos recombinantes en Bt407 | 32 |
| 5 | Análisis Western de las proteínas totales de Ec recombinante | 34 |
| 6 | Electroforesis en gel de poliacrilamida de los extractos de proteínas totales de las clonas de Bt 407 | 34 |
| 7 | Electroforesis en gel de poliacrilamida de los extractos de proteína total de las clonas de Bt 407 tratados con tripsina | 35 |
| | | |
| Tablas | | |
| 1 | Clasificación de las d-endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> | 8 |
| 2 | Secuencia y ubicación de los oligonucleótidos usados como iniciadores en las reacciones de PCR | 20 |
| 3 | Tamaño de las regiones codificantes de cada dominio de los genes <i>cry1Ac1</i> y <i>cry3Aa1</i> | 30 |
| 4 | Fragmentos de restricción esperados para las diferentes construcciones realizadas | 31 |
| 5 | Fragmentos de restricción esperados para los plásmidos recombinantes de Bt | 33 |
| 6 | Porcentaje de mortalidad obtenido con extractos de proteína total de las clonas recombinantes de Bt 407 | 35 |

RESUMEN

La δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* es letal para larvas de insectos lepidópteros y coleópteros, entre otros. Su modo de acción es a nivel intestinal provocando la lisis de las células epiteliales. Esta toxina es una proteína que consta de tres dominios estructurales, que podrían tener un rol diferente en el mecanismo de acción molecular. El objetivo del presente trabajo fue determinar el papel de cada dominio usando proteínas activas contra lepidópteros (Cry1Ac1) y coleópteros (Cry3Aa1). Se generaron, mediante ingeniería genética, toxinas quiméricas, realizando intercambios homólogos de los tres dominios por separado. Los genes quiméricos fueron clonados en *Escherichia coli* mediante el vector pUC19. Los plásmidos recombinantes construidos fueron pTC1 (construcción CTT, el orden de las letras indica el dominio, C indica procedente de *cry1Ac1* y T de *cry3Aa1*), pCT1 (TCC), pCT2 (CTC) y pTC3 (TTC). La expresión de los genes quiméricos en *E. coli* fue muy baja, por lo que fueron subclonados en *B. thuringiensis* mediante el vector pHT315. Los genes clonados en *B. thuringiensis* fueron expresados a un nivel adecuado, y las proteínas recombinantes pudieron ser aisladas y purificadas. Las proteínas fueron digeridas con tripsina, y aunque resultaron ligeramente propensas a proteólisis, se obtuvieron fragmentos proteicos del tamaño esperado para las toxinas activas. Con las toxinas activas y purificadas, se realizaron bioensayos con larvas neonatas del lepidóptero *Trichoplusia ni*, a fin de evaluar la actividad biológica de las mismas. Los resultados de porcentaje de mortalidad fueron los siguientes : CCC, 98.7% ; TTT, 1.3% ; TCC, 90% ; CTT, 2.7% ; CTC, 30.7% ; TTC, 58.7%. Estos resultados indican claramente que el reemplazo del dominio I no fue capaz de alterar la actividad insecticida en las toxinas quiméricas, lo que descarta su participación en la especificidad de las toxinas. Por otra parte, la sustitución del dominio II o III alteró notablemente la actividad biológica de las quimeras, lo que muestra que ambos dominios están involucrados en la especificidad. Los resultados de este trabajo permiten proponer un modelo para el mecanismo de acción a nivel molecular, donde el dominio I participa exclusivamente en la toxicidad, mientras que los dominios II y III son, en conjunto, responsables de la especificidad.

INTRODUCCION

Desde hace más de cuatro décadas, *Bacillus thuringiensis* (Bt) ha sido el agente de control biológico más exitoso del mundo. Su utilización en el control de insectos plaga ha demostrado ser altamente efectiva, ya que su espectro de acción incluye insectos de importancia agrícola y médico-veterinaria, principalmente pertenecientes a los órdenes Coleóptera, Díptera y Lepidóptera. Su participación en los programas de manejo integrado de plagas ha permitido disminuir considerablemente la aplicación de insecticidas químicos en los ecosistemas naturales. Las razones principales del éxito de este entomopatógeno son su gran efectividad y selectividad contra la plaga y la baja residualidad que impide o retrasa la aparición de resistencia.

Bt es una bacteria bacilar cosmopolita. En forma de esporas se encuentra de forma natural en suelo, hojas, granos, cadáveres de insectos, etc. Al momento de esporular, produce inclusiones cristalinas llamadas cuerpos paraesporales. El principal componente de dichos cuerpos es una o varias proteínas llamadas δ -endotoxinas. Estas proteínas son las responsables de la patogenicidad del microorganismo. Son toxinas de acción intestinal que provocan la muerte del insecto susceptible al momento de ser ingeridas con el alimento, por lisis masiva de las células epiteliales del intestino medio (Aronson 1993).

Las δ -endotoxinas constituyen una gran familia de proteínas relacionadas, en conjunto reciben el nombre de proteínas Cry (por crystal). A la fecha se conocen más de 120 toxinas diferentes, algunas con actividad hacia otros invertebrados como nemátodos, platelmintos, protozoarios, ácaros, áfidos (Meadows et al. 1990, Payne et al. 1992, Thompson 1992, Feitelson 1992). En base a su similitud en estructura primaria, se han identificado 18 clases distintas. Existe un gran esfuerzo mundial por buscar proteínas Cry con actividades nuevas que permitan dirigirlas hacia otros insectos insensibles a las que se conocen actualmente (Lorence y Quintero 1996)

La capacidad de producir estas toxinas le confiere a Bt un alto interés económico agregado. Pero además, la biología molecular de estas toxinas es sorprendente y

constituye un excelente modelo para el estudio de las relaciones estructurales y funcionales de proteínas.

A este respecto, las proteínas Cry son únicas en cuanto a estructura se refiere ya que se ha determinado, por estudios cristalográficos, que constan de tres dominios estructurales bien definidos (denominados simplemente como I, II y III de amino a carboxilo terminal). Resulta sorprendente que, al comparar la estructura de las únicas dos toxinas cuya conformación espacial ha sido resuelta (Cry1Aa1 y Cry3Aa1), exhiban un parentesco estructural extraordinariamente estrecho; considerando que sólo muestran entre sí una similitud del 36% en cuanto a secuencia de aminoácidos (Li et al. 1991, Grochulski et al. 1995). Además, los insectos blanco son diferentes: Cry1Aa1 ataca lepidópteros, mientras Cry3Aa1 coleópteros. Esto indica claramente que la mecánica del modo de acción es semejante para estas toxinas.

Por sus características estructurales y bioquímicas, se ha sugerido que cada dominio desempeña un rol específico en el mecanismo de acción de las delta endotoxinas: al dominio I se le ha señalado como responsable de la toxicidad, al II de la especificidad y el III su papel no es muy claro, podría estar implicado en la toxicidad, especificidad o en la estabilidad de la proteína (Lorence y Quintero 1996).

Ya que los dominios de una proteína representan módulos independientes de plegamiento; es posible suponer que sus actividades pueden ser disectadas y estudiadas de manera aislada (Cunningham et al. 1989). Esto ofrece la posibilidad de manipular mediante ingeniería genética las proteínas Cry, y establecer de un modo más preciso la relación estructura-función de cada dominio. Esto permitiría comprender en términos estructurales, la participación de cada dominio en el mecanismo de acción global; lo que además de ampliar el conocimiento básico acerca de la relación estructura-función en proteínas, conduciría a la construcción racional de toxinas más selectivas y eficaces.

HIPOTESIS

En las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*, el dominio I desempeña un papel importante en la toxicidad, el dominio II participa en la especificidad, mientras que el dominio III está involucrado en la estabilidad estructural de la proteína y/o en la especificidad.

OBJETIVO GENERAL

Diseñar, mediante ingeniería genética, toxinas Cry híbridas, reemplazando recíprocamente los dominios estructurales de las toxinas Cry1Ac1 y Cry3Aa1 y ensayar el efecto de los reemplazos en su actividad insecticida.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Delimitar las regiones génicas codificantes de los dominios de Cry1Ac1 y Cry3Aa1 mediante la creación de sitios únicos de restricción, por mutagénesis sitio-dirigida por PCR.
- 2) Intercambiar recíprocamente las regiones codificantes de los dominios para producir genes mutantes híbridos y clonarlos en *Escherichia coli* (Ec).
- 3) Subclonar los genes mutantes híbridos en una cepa acristalífera de Bt.
- 4) Producir las toxinas quiméricas en Bt.
- 5) Analizar la actividad tóxica de las quimeras contra el lepidóptero *Trichoplusia ni* (T ni)

ANTECEDENTES

La familia de proteínas Cry

Las proteínas Cry forman una de las familias de proteínas más extensas. Desde la clonación de la primera toxina en 1981 (Schnepf y Whiteley 1981) se han descubierto más de 120 toxinas diferentes (Lorence y Quintero, 1996)

Estas proteínas se agrupan en 18 clases (Cry1, Cry2,...Cry18), en base a su similitud de secuencia de aminoácidos. Entre los miembros de cada clase, existe una similitud del 46%. Cada clase consta de subclases, donde la similitud es del 78%; estas se indican mediante una letra mayúscula (por ejemplo Cry1A, Cry1B,...Cry1K). A vez, cada subclase consta de agrupaciones menores que contienen proteínas estrechamente relacionadas, con una homología mínima de 96%. Para representarlas se emplea una letra minúscula, en seguida de la letra que indica la subclase (Cry1Aa, Cry1Ab,...Cry1Ae). Finalmente, dentro de este último nivel, cada proteína se identifica con un número que indica el orden cronológico de publicación de su secuencia (Cry1Aa1, Cry1Aa2,...Cry1Aa5; Crickmore et al. 1995).

Los miembros de esta familia difieren ampliamente en su especificidad; la mayoría son toxinas activas contra las fases larvarias de lepidópteros (casi todas las Cry1, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry9Aa, Cry9Ca y Cry15), algunas hacia larvas o adultos de coleópteros (Cry3, Cry7, Cry5Ba, Cry8Ba y Cry8Ca), larvas de dípteros (Cry1Ha, Cry4, Cry10 y Cry11), o larvas y adultos de nemátodos (Cry13) (Tabla 1)

Algunas presentan actividad dual (Cry1Ia contra lepidópteros y coleópteros, Cry1Ab, Cry1Ca y Cry2Aa contra lepidópteros y dípteros, Cry5Aa, Cry5Ab, Cry6 y Cry12 contra nemátodos y ácaros, Cry8Aa contra coleópteros y ácaros, Cry14 contra dípteros y coleópteros), sólo una muestra actividad triple (Cry1Ba contra lepidópteros, coleópteros y áfidos) y para otras no se ha determinado su hospedero (Cry1G, Cry1J, Cry1K, Cry9Ba, Cry9Da, Cry16,17 y 18). Además, se conoce la existencia de otras toxinas con hospederos distintos como himenópteros, platelmintos y protozoarios, o con

actividad dual o triple; pero no han sido clasificadas ya que sus secuencias no se encuentran disponibles en los bancos de datos (Lorence y Quintero 1996)

Tabla 1. Clasificación de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*¹

| Toxina | Peso Molecular (kDa) | Hospedero ² | Toxina | Peso Molecular (kDa) | Hospedero |
|--------|----------------------|------------------------|--------|----------------------|-----------|
| Cry1A | 133 | L | Cry6A | 54 | N/A |
| Cry1B | 139 | L | Cry6B | 44 | N/A |
| Cry1C | 135 | L | Cry7A | 129 | C |
| Cry1D | 133 | L | Cry8A | 131 | C/A |
| Cry1E | 133 | L | Cry8B | 133 | C |
| Cry1F | 133 | L | Cry8C | 130 | C |
| Cry1G | 132 | ND | Cry9A | 129 | L |
| Cry1H | 133 | ND | Cry9B | 126 | L |
| Cry1I | 81 | L | Cry9C | 130 | L |
| Cry1J | 133 | ND | Cry10A | 78 | D |
| Cry1K | 138 | ND | Cry11A | 72 | D |
| Cry2A | 71 | L/D | Cry11B | 80 | D |
| Cry3A | 74 | C | Cry12A | 142 | N/A |
| Cry3B | 75 | C | Cry13A | 88 | N |
| Cry3C | 73 | C | Cry14A | 72 | D/C |
| Cry4A | 134 | D | Cry15A | 37 | L |
| Cry4B | 128 | D | Cry16A | ND | ND |
| Cry5A | 152 | N/A | Cry17A | ND | ND |
| Cry5B | 139 | C | Cry18A | ND | ND |

¹ Adaptada de Lorence y Quintero, 1996.

² A : ácaros, C : coleópteros, D : dípteros, L : lepidópteros, N : nemátodos, ND : no determinado. Sólo se indican los hospederos principales

Estas proteínas son sintetizadas como protoxinas inactivas con pesos moleculares de 70-80 (Cry2, 3, 10 y 11) o 125-145 kDa (Cry1, 4, 5Ab, 5Bc, 7, 8 y 9), excepto Cry5Aa, Cry6Aa, 6Ba y Cry15 que presentan pesos moleculares de 152.3, 54, 44 y 34 kDa, respectivamente (Lorence y Quintero, 1996). Se piensa que las protoxinas de 70-80 kDa son péptidos truncados naturales de las de 125-145 kDa. Para ser funcionales, requieren un procesamiento proteolítico en el organismo susceptible que rinde un fragmento activo de alrededor de 65 kDa (Höfte y Whiteley, 1989).

Todas las toxinas estudiadas a la fecha han mostrado ser altamente específicas hacia el organismo blanco, y no muestran toxicidad hacia vertebrados. Además presentan una elevada actividad molar, con CL_{50} generalmente menores a 50 ng/cm² de dieta, llegando en algunos casos a valores tan bajos como 1.08 ng/cm² (Lorence y Quintero, 1996).

Con la notable excepción de Cry3Aa, las δ -endotoxinas son sintetizadas en grandes cantidades hasta la fase de esporulación (Agaisse y Lereclus, 1994). La gran cantidad de proteínas Cry sintetizada (entre 25-30% p/v) durante la etapa en que la bacteria se encuentra en escasez de nutrientes, hace suponer que desempeñan un papel crucial en el ciclo biológico del microorganismo (Vázquez-Juárez, 1997). Se especula que estas toxinas le confieren a Bt la capacidad de obtener un nicho ecológico favorable en los invertebrados susceptibles, donde crecer y diversificarse. También se ha postulado que el cuerpo paraesporal pudiera servir como fuente de carbono y nitrógeno, durante la germinación de las esporas (Martin 1994)

A pesar de la diversidad de estructura primaria y hospederos observada en las δ -endotoxinas, el modo de acción es idéntico: su sitio blanco es el intestino medio de los organismos que atacan donde provocan la lisis coloidosmótica de las células epiteliales. No se ha observado ningún efecto patológico considerable sobre otros tejidos a concentraciones fisiológicamente aceptables (Bravo et al., 1992a).

Modo de Acción de las δ -endotoxinas

El modo de acción de las δ -endotoxinas se ha estudiado profusamente en lepidópteros, dípteros y coleópteros. Una vez que el insecto ingiere los cristales, se ha determinado que el síndrome patológico consta de varias etapas:

- 1) solubilización de las protoxinas en el intestino medio,
- 2) activación proteolítica de las protoxinas,
- 3) unión de las toxinas activas al epitelio intestinal y,
- 4) formación de un canal acuoso en la membrana celular del epitelio.

Solubilización

El primer paso, después que los cristales han sido ingeridos, consiste en la solubilización de las protoxinas. En lepidópteros y dípteros, se ha determinado que el proceso requiere del elevado pH que ocurre en la porción anterior del intestino. En este sitio, el pH puede alcanzar un valor de 12, el más alto registrado para cualquier organismo (Knowles y Dow, 1993).

Durante la solubilización de las toxinas Cry1 (que son activas preferentemente hacia lepidópteros), gracias al carácter fuertemente reductor del intestino larvario, ocurre el rompimiento de puentes disulfuro que son formados en las porciones carboxilo terminal de las protoxinas (Bietlot et al. 1990)

En coleópteros la situación es distinta, el pH del intestino suele ser ligeramente ácido (Schwartz et al. 1993). En estas condiciones, las interacciones electrostáticas entre grupos con cargas opuestas (puentes salinos) en las protoxinas pudieran debilitarse.

En las toxinas Cry3, que no cuentan con la porción carboxilo terminal de las Cry1, se ha demostrado que el empaquetamiento de las protoxinas en los cristales involucra la formación de puentes salinos de cada molécula con cuatro adyacentes, por lo que el pH ácido favorece su separación (Li et al., 1991).

Así, parece que cada toxina se encuentra "adaptada" a las condiciones fisicoquímicas prevalecientes en el intestino del insecto blanco, lo que permite su solubilización. Se ha sugerido que en algunos casos una falla en la solubilización podría conducir a una pérdida de la actividad hacia el insecto blanco (Aronson, 1991).

Activación

En seguida, las protoxinas recién liberadas del cristal deben ser procesadas proteolíticamente, por enzimas del grupo serín-proteasas tipo tripsina, producidas naturalmente por el insecto. Este procesamiento remueve casi la mitad carboxilo terminal de las protoxinas de 125-145 kDa (alrededor de 500 aminoácidos) que, aunque es la región más conservada, no participa en la toxicidad y, como se mencionó anteriormente, está involucrada en la formación del cristal y la solubilización de la protoxina (Schnepf y Whiteley, 1985; Wabiko, et. al 1985; Raymond, et. al 1990). Además, se eliminan unos 28 aminoácidos del amino terminal.

En las protoxinas de 70-80 kDa sólo son eliminados unos 57 aminoácidos a partir del N-terminal. Esto da como resultado que las toxinas activas, independientemente del tamaño de la protoxina, tengan pesos moleculares de 50-70 kDa.

Se ha sugerido que la activación proteolítica podría ser la responsable de la especificidad hacia el insecto plaga, porque la activación de protoxinas letales para lepidópteros y dípteros con jugos intestinales de los segundos, dió toxinas activas sólo contra dípteros, mientras que la activación con jugo de lepidóptero dió toxinas contra ambos órdenes (Haider, et. al 1986).

No obstante, se ha determinado que el patrón electroforético y la actividad de las proteasas intestinales de cepas de *Plodia interpunctella* resistentes a las d-endotoxinas, son idénticos a los de cepas sensibles (Johnson, et. al 1990); además las protoxinas se pueden activar por acción de jugos gástricos de insectos no blanco (Ogiwara, et. al 1992), e incluso *in vitro* usando tripsina sin afectar la actividad insecticida (Nagamatsu, et. al 1984).

Lo anterior demuestra que en algunos casos, la resistencia a cierta toxina puede residir en una falla en el mecanismo de activación, sin embargo, deben existir otros factores que se encuentren involucrados en el desarrollo de la resistencia.

Unión al receptor

Uno de los pasos considerado crucial en la actividad tóxica de las d-endotoxinas es la unión a una o varias moléculas receptoras localizadas en el epitelio intestinal (Hofmann, et. al 1988; Van Rie, 1990a). Estos receptores unen con alta afinidad las toxinas, ya que las constantes de afinidad calculadas (K_d) oscilan entre 0.2 y 20 nM. La concentración de los mismos ($B_{máx}$) varía entre 2 a 304 pmoles/ μ g de proteína de membrana epitelial del intestino (Lorence y Quintero, 1996)

Respecto a la naturaleza bioquímica de los receptores, se han detectado varias glicoproteínas capaces de unir toxinas en el intestino de lepidópteros y en coleópteros (Belfiore, et. al 1994); y se ha demostrado que estas proteínas pertenecen a la familia de las aminopeptidasas N (Sangdal, et. al 1994; Knigh, et. al 1994), aunque se han encontrado algunos receptores que están emparentados con la superfamilia de las cadherinas (Vadlamudi et al. 1995)

También se ha demostrado que los receptores se encuentran únicamente en el borde apical del intestino medio, ya que la localización inmunocitoquímica de las toxinas en los intestinos de larvas intoxicadas, mostró que su sitio de unión es precisamente esta región, donde se adhieren con alta afinidad (Bravo, et. al 1992a,b; Ravoahangimalala, et. al 1993).

Además se ha visto que el desarrollo de resistencia de un insecto para una toxina determinada, está correlacionado con la pérdida o modificación de estos receptores (Van Rie, 1990b). De hecho, se considera que esta etapa es la más importante dentro del desarrollo del daño, y que la eventual aparición de resistencia en las plagas puede deberse a un bloqueo de la unión al receptor.

Sin embargo, la sola presencia del receptor parece ser insuficiente para el despliegue completo de la toxicidad, porque en algunos casos se determinó que la

unión al receptor estuvo inversamente relacionada con la toxicidad (Wolfersberger, 1990; Van Rie et al., 1990; Garczynski et al., 1991).

Además, debe reconocerse que a concentraciones no fisiológicas, la toxinas pueden insertarse espontáneamente en membranas sintéticas (Slatin, 1990) o liposomas (Yunovitz y Yawetz, 1988; Haider y Ellar, 1989), alterando la integridad de dichas membranas en las cuales los supuestos receptores están ausentes.

Por lo tanto, para que una δ -endotoxina sea tóxica es indispensable su unión al receptor; sin embargo, esto es sólo la primera etapa y seguramente existen factores adicionales que condicionan la acción de la toxina una vez acoplada al receptor, recordando que algunas que se unen a la membrana son atóxicas. Esto lleva a la sugerencia de que la toxicidad y la especificidad deben radicar en estructuras diferentes en la misma molécula.

Formación de poro

Cualquiera que sea la interacción toxina-receptor, no hay duda de que el evento indispensable para la toxicidad es la formación de poros transmembranales. Estos tienen un diámetro de 0.6-1.0 nm (Knowles y Ellar, 1987) y son selectivos para iones potasio (Sacchi, 1986; Slatin, 1990) o cloruro, según el pH del medio (Schwartz, et. al 1993); y pueden ser bloqueados con calcio y bario (Crawford y Harvey, 1988).

Estos poros ocasionan la entrada de cationes y agua hacia el interior celular, lo que provoca el hinchamiento y alcalinización de las células intestinales. Estos eventos conducen a hipertrofia y rompimiento de las células afectadas. La continuidad del epitelio intestinal se ve abatida y ocurre invasión del contenido intestinal hacia el hemocele. Esto conduce a septicemia, por la explosiva germinación de las esporas de Bt. El insecto deja de alimentarse, su intestino se paraliza, y en poco tiempo sufre vómito, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte (Mathavan, 1989; Bauer, 1992).

Se han propuesto varios modelos acerca de la participación de la toxina y el receptor en la formación del poro. En base algunos datos experimentales se ha propuesto que la unión de la toxina podría activar al receptor y que por sí mismo se

constituya en un canal transmembranal. En otro modelo, el receptor y la toxina (o parte de ella) pudieran formar el canal acuoso.

Una tercera hipótesis sugiere que la toxina por sí sola, ya sea en forma mono o multimérica, forma el poro, y que el receptor juega un papel de catalizador de la inserción transmembranal. La "catálisis" efectuada por el receptor podría consistir simplemente en aumentar la concentración de la toxina en la membrana epitelial, o en provocar un cambio conformacional en la toxina que la induzca a un estado competente para la inserción. Las evidencias apoyan de manera mas ostensible la tercera hipótesis (Knowles y Dow, 1993).

Estructura de las δ -endotoxinas

En 1991, Li y col. publicaron la estructura tridimensional de Cry3Aa1 (Figura 1). En 1995, Grochulski et al., resolvieron la estructura de Cry1Aa1 y sorprendentemente, a pesar de que sólo comparte alrededor de un 30% de identidad de estructura primaria con Cry3Aa1, su arreglo espacial es idéntico al de esta última, con algunas diferencias hacia la porción central de ambas toxinas. Se encontró que cada toxina está formada por tres dominios bien definidos los cuales, en base a su estructura tridimensional, reúnen las características para efectuar cada uno una función específica en la actividad tóxica.

Dominio I

El dominio I, que se localiza del residuo 58 al 290 en Cry3Aa y del 33 al 253 en Cry1Aa; está constituido por siete α -hélices anfipáticas, seis de ellas dispuestas en forma circular y una, la α 5, al centro. Las alfa hélices son suficientemente largas para atravesar los 30 Angstrom de una membrana celular. Esta región es semejante a los dominios formadores de poros de la colicina A y de la toxina diftérica (Parker 1989).

Se ha sugerido que el dominio I podría funcionar en el daño a la membrana a través de la formación de los canales iónicos antes mencionados, actuando por sí solo en una molécula o en sinergismo con los dominios I de otras (Li, et. al 1991). A este

respecto, se han sugerido dos modelos: uno donde las hélices 5 y 6 iniciarían la penetración, alterando la estructura de manera que las caras hidrofóbicas de las hélices queden invertidas con respecto a su posición original (modelo del "cortapluma"); el otro sugiere que el ataque lo iniciarían las hélices 4 y 5 (modelo del "paraguas") (Knowles y Dow, 1993)

La hélice $\alpha 5$ por sí sola (que se encuentra altamente conservada entre las diferentes toxinas Cry), es capaz de insertarse en membranas lipídicas (Gazit y Shai, 1993). Además, las mutaciones puntuales realizadas en las regiones conservadas y que disminuyeron la toxicidad de algunas proteínas sin afectar la unión al receptor, mapean en posiciones equivalentes en el dominio I de Cry3Aa1 (residuos 163 al 170), particularmente en la hélice $\alpha 5$ (Haider y Ellar, 1989a; Ahmad y Ellar, 1990; Wu y Aronson, 1992). Se logró subclonar la región que codifica el dominio I de Cry3Bb1, y se observó que el péptido producido por las células recombinantes es capaz de afectar la permeabilidad de membranas lipídicas sintéticas (Von Tersch, et. al 1994).

Dominio II

El dominio II se encuentra entre los residuos 291-500 en Cry3Aa y 265-461 en Cry1Aa y está formado por tres láminas β -plegadas; cada una consta de varias tiras tipo β . Se ha observado que dos de estas láminas se configuran en forma de "Y" y terminan en una estructura tipo asa en una pequeña región en el ápice de la molécula (Li, et. al 1991). Esta estructura es tan particular que ha merecido un lugar dentro de los arreglos tridimensionales de dominios proteicos y ha sido llamado "prisma triangular" (Chothia y Murzin 1993). A la fecha, este arreglo ha sido detectado además en la proteína I de la capa externa de la membrana vitelina (VMO-I), y se ha sugerido que este plegamiento puede ser un dominio estructural asociado funcionalmente con la unión a carbohidratos (Shimuzu y Morikawa 1996).

Se ha propuesto que este dominio podría interactuar con los receptores intestinales, y ser así el responsable de la especificidad de la toxina. Esto se ve reforzado por la estructuración tan diferente que manifiestan ambas toxinas Cry en este dominio, sobretudo en las asas del ápice del dominio, donde la divergencia estructural

es muy marcada. Además, cabe mencionar que para varias toxinas se han delimitado las regiones determinadoras de especificidad, a través del intercambio recíproco de secuencias entre toxinas relacionadas, pero de especificidad diferente. Se ha determinado que estas regiones mapean en posiciones equivalentes en el dominio 2 de Cry3Aa1.

Así, la región que determina la especificidad doble de Cry2Aa1 (residuos 307-382) para lepidópteros y dípteros (Widner y Whiteley, 1990), corresponde a la lámina 1 del dominio II, mientras que la región que determina la especificidad de Cry1Aa1 contra *Bombyx mori* (residuos 332-450), mapea en la lámina 2 (Ge, et. al 1992). Similarmente, las regiones que determinan la especificidad de CryIAa1 y CryIAc1 contra *Manduca sexta* (residuos 429-447) y *Heliothis virescens* (residuos 332-722) mapean principalmente en el dominio II, aunque alguna parte de la región de especificidad contra *H. virescens* se extiende hasta el dominio III (Schnepf, et. al 1990).

Dominio III

El dominio III, que va del residuo 501 al 644 en Cry3Aa y del 463 al 609 en Cry1Aa, está formado por dos láminas β -plegada antiparalelas conformadas en una estructura llamada sandwich β . Por su localización en el extremo carboxilo y por su arreglo espacial (contactando y cubriendo los otros dominios), se ha pensado que podría ser el responsable de estabilizar la estructura de la proteína y conferirle resistencia a degradación ulterior una vez activada.

Sin embargo, también ha sido implicado como responsable de la especificidad, ya que el intercambio recíproco de esta región entre Cry1Ca1 y Cry1Ea1 alteró la actividad de estas toxinas contra *Mamestra brassicae* y *Spodoptera exigua*. Sin embargo, es importante mencionar que los intercambios se efectuaron mediante recombinación *in vivo* donde no se pueden controlar en forma precisa las regiones intercambiadas y, lo que es más notable, a pesar de haberse alterado la especificidad de algunas toxinas quiméricas, no se afectó su unión a los receptores.

Por otra parte, algunas quimeras que diferían sólo en el sitio de recombinación por unos cuantos residuos, fueron degradadas totalmente por la tripsina. Esto parece confirmar que la función de este dominio no es propiamente la unión al receptor, sino más bien el proporcionar protección a la toxina contra la degradación, tal vez auxiliando el plegamiento correcto de los otros dominios (Bosch, et. al 1994).

La evidencia experimental antes mencionada apunta hacia un mecanismo común en el modo de acción de las δ -endotoxinas, asignando a cada dominio de la toxina una función específica e independiente. La construcción de toxinas quiméricas permitiría determinar si la función de cada dominio es en realidad la propuesta, lo que conduciría a interpretar en términos estructurales, los eventos involucrados en el mecanismo de acción. Eventualmente, este conocimiento abriría las puertas a la posibilidad de manipular, por ingeniería de proteínas, estas toxinas, con el fin de ampliar el espectro de acción o contender con pleno conocimiento de causa con la aparición de resistencia en los insectos blanco.



Figura 1. Estructura tridimensional de Cry3Aa1. Representación realizada por computadora a partir de los datos obtenidos por difracción de rayos X. La dirección es de izquierda (amino terminal) a derecha (carboxilo terminal).

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas bacterianas usadas fueron *Escherichia coli* BL21 [F⁻ dcm⁻ ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) lon⁻ gal] como receptora de los plásmidos utilizados en los experimentos de transformación. *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* HD-73 (de la Colección Internacional de Bacilos Entomopatógenos de la FCB-UANL, Rodríguez-Padilla, et. al 1993), se usó como fuente del gen *cry1Ac1*, ya que esta cepa contiene únicamente este gen *cry* en forma natural. *Bacillus thuringiensis* 407 es una cepa acristalifera que fue donada por la Dra. Alejandra Bravo (Instituto de Biotecnología, UNAM). Esta cepa fue usada para la producción de las toxinas quiméricas.

Los plásmidos empleados fueron pBT3A2 (pUC19 con el gen *cry3Aa1* de Bt subsp *tenebrionis*), proporcionado por el Dr. J. Van Rie (Plant Genetic Systems, Ghent Bélgica) y pUC19 como vehículo de clonación de los genes modificados (Boheringer-Manheim, Manheim Alemania). pUC19 tiene el gen de resistencia a ampicilina como marcador (Yanisch-Perron, 1985). El plásmido pHT315 fue usado como vehículo para la clonación de los genes quiméricos en Bt 407. Este plásmido posee orígenes de replicación para Ec y Bt, y como marcadores de selección los genes de resistencia a ampicilina y eritromicina. Además posee íntegra la región múltiple de clonación de pUC19.

Delimitación de los dominios de *cry1Ac1* y diseño de oligonucleótidos

Obtención de secuencias de cry1Ac1 y cry3Aa1

Las secuencias de los genes en estudio fueron obtenidos del Genbank mediante Internet. Las claves de acceso para la búsqueda de secuencias fueron: para *cry1Ac1*, M11068 (Adang, et. al 1985) y para *cry3Aa1*, Y00420 (Höfte, et. al 1987).

Comparación de la estructura secundaria

Se empleó el programa Predict 7 (Cármenes, et. al 1989), con el que se obtuvieron los perfiles de hidropatía e hidrofobicidad, así como la probabilidad de formar estructuras secundarias (α -hélices, tiras β , rizos y vueltas), de las secuencias de aminoácidos deducidas de cada gen. Se usaron ventanas de seis residuos y el análisis se efectuó en una computadora INTEL 80486 DX2. Con la información obtenida, se compararon las estructuras secundarias de ambas toxinas y se estableció un alineamiento a nivel de aminoácidos, lo que permitió definir cada dominio en Cry1Ac1.

Diseño de oligonucleótidos

Para los experimentos de PCR, se diseñaron oligodesoxirribonucleótidos (oligos) que flanquearon cada dominio en sus extremos 5' y 3' y que a la vez introdujeron sitios únicos para enzimas de restricción (Tabla 2). Los sitios de restricción delimitantes del dominio I fueron *Pst*I y *Bam*HI para *cry1Ac1* y *Hind*III y *Bam*HI para *cry3Aa1* (el sitio *Hind*III no fue introducido ya que el gen había sido clonado en este lugar en pUC19; *Pst*I no se usó porque *cry3Aa1* tiene un sitio para esta enzima en la región codificante del dominio I). En ambos genes, se crearon los sitios *Bam*HI y *Bgl*II para el dominio II y para el dominio III, *Bgl*II y *Kpn*I.

Estos sitios fueron elegidos porque no alteran el marco de lectura y porque no se encuentran en forma natural en las regiones que codifican para los dominios (excepto el ya mencionado *Pst*I en *cry3Aa1*). Los oligos diseñados, antes de ser sintetizados, fueron analizados con el programa Oligo (versión 3.3, Natl. Biosciences Inc., MN. U.S.A.) y Amplify (versión 1.2b, Engels, 1992. Un. Winsconsin).

El programa Oligo fue útil para determinar formación de estructuras secundarias y de dímeros en los oligos, mientras que el Amplify analizó la capacidad de los oligos para iniciar la PCR en un ensayo simulado de amplificación génica con el que también se obtuvieron las temperaturas y los tiempos de alineamiento óptimos para cada oligo.

TABLA 2. Secuencia y ubicación de los oligonucleótidos usados como iniciadores en las reacciones de PCR.

| Nombre | Secuencia | Posición | Tm (°C) |
|--------|--|-------------|---------|
| BP7 | 5' <u>TTTAGTCTGCAGTTAGTTGCACTTTGTGC</u> 3' 29mero, introduce sitio para <i>Pst</i> I* | -128 a -102 | 70.00 |
| ZJ6 | <u>CCTATGATGGATCCAGAAGATATCC</u> 27mero, introduce sitio para <i>Bam</i> HI* | 748 - 767 | 72.00 |
| ZJ7 | <u>CTTCTGGATCCATCATAATTCGGGAACAG</u> 29mero, introduce sitio para <i>Bam</i> HI* | 736 - 761 | 84.00 |
| ZJ8 | <u>ATACATAGATCTGCTGAATTTAAT</u> 24mero, introduce sitio para <i>Bgl</i> II* | 1366 -1389 | 60.00 |
| ZJ9 | <u>TCAGCAGATCTATGTATCCAAGAGAACA</u> 28mero, introduce sitio para <i>Bgl</i> II* | 1355 -1382 | 78.00 |
| ZJ10 | <u>CTCATCAAAGGTACCTGATAGTGTGAC</u> 27mero, introduce sitio para <i>Kpn</i> I* | 2161- 2187 | 78.00 |
| ZJ14 | <u>GAATTCAGATCTGAGCTCGGTACCC</u> 25mero, introduce sitio para <i>Bgl</i> II**A | 37 - 57A | 60.00 |
| LD1 | <u>GGGTATAGGATCCGAACATCATACAATGG</u> 29mero, introduce sitio para <i>Bam</i> HI** | 1415 -1441 | 78.00 |
| LD2 | <u>GATGTTCCGATCCTATACCCAAAAGAAGTT</u> 30mero, introduce sitio para <i>Bam</i> HI** | 1424 -1450 | 78.00 |
| LD3 | <u>GTAAAAAGATCTACACTTTTATGTGTCC</u> 29mero, introduce sitio para <i>Bgl</i> II** | 2043 -2071 | 72.00 |
| LD4 | <u>AAGTGTAGATCTTTTAAACATGATTGATTG</u> 31mero, introduce sitio para <i>Bgl</i> II** | 2053 -2083 | 76.00 |
| LD6 | <u>CTTCAGGTACCTTCAAAAAGCGAAAG</u> 26mero, introduce sitio para <i>Kpn</i> I** | 2595 -2620 | 70.00 |

La secuencia subrayada indica el sitio para la enzima de restricción indicada en cada caso.

- * Diseñados para amplificar *cry1Ac1*
- ** Diseñados para amplificar *cry3Aa1*.
- A Está ubicado en pUC19.

Mutagénesis sitio-dirigida de *cry1Ac1* y *cry3Aa1*

Para introducir los sitios de restricción en los límites de cada dominio, se usó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los oligos fueron diseñados de tal modo que, aunque introdujeron mutaciones puntuales, no cambiaron el marco de lectura; algunos introdujeron cambios en uno o dos codones en regiones de unión de dos dominios, pero los cambios fueron conservados y no afectaron la estructura de la toxina, según se determinó con el programa Predict 7. Los oligos fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Mor.).

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: DNA templado 5 ng/ml, oligos 2 mM, dNTPs 0.8 mM, ADN polimerasa Taq 0.05 U/ μ l, buffer, volúmen total 100 μ l. Las reacciones se efectuaron en un termociclador de ADN Perkin-Elmer (Cetus Co. Emeryville, Ca. E.U.), y fueron verificadas en electroforesis en gel de agarosa. Los ensayos se hicieron por duplicado, a fin de obtener mayor cantidad de cada dominio para las manipulaciones subsecuentes. A todas las reacciones de PCR exitosas se les eliminó el aceite y el ADN fue purificado.

PCR de cry3Aa1

Para las PCR de los dominios de *cry3Aa1* se usó como templado el plásmido pBT3A2 purificado. Los oligos fueron: ZJ14 y LD1 para el dominio I, LD2 y LD3 para el dominio II, y LD4 y LD6 para el dominio III.

PCR de cry1Ac1

Se utilizó el método descrito por Cerón, et. al 1994, para obtener el ADN templado mediante lisis por ebullición de las células de *B. thuringiensis* HD-73. Se colocó una asada de un cultivo de 12 h de la cepa crecida en agar LB en 100 μ l de agua miliQ, y se hirvió a baño maría durante 10 min. De este lisado se tomaron 30 μ l y

se usaron para montar la PCR. Los oligos usados fueron BP7 y ZJ7 para el dominio I, ZJ6 y ZJ9 para el dominio II, y ZJ8 y ZJ10 para el dominio III.

En los primeros ensayos, se utilizó una temperatura de alineamiento de 60°C, tal como para los demás ensayos de PCR, pero los oligos del dominio II no amplificaron. Por esto se disminuyó la temperatura de alineamiento a 50°C para el dominio II. También se aumentaron los ciclos de 25 a 30, para tener mayor amplificación de los tres dominios. De esta manera, la temperatura de alineamiento y el número de ciclos fueron diferentes con respecto a las PCR de *cry3Aa1*

Subclonación del Dominio I

Preparación del ADN vector e inserto

El plásmido pUC19 y los dominios I de los dos genes en estudio, una vez purificados fueron digeridos con las enzimas *Pst*I (*cry1Ac1*) o *Hind*III (*cry3Aa1*). Después se purificaron de nuevo y se verificó el éxito de la digestión observando la linearización del pUC19 en un gel de agarosa. Se efectuó una segunda digestión con *Bam*HI de los dominios de ambos genes y del vector, se purificó el ADN y se verificó el funcionamiento de la enzima al digerir simultáneamente una muestra de vector superenrollado y observando su linearización en un gel de agarosa. Enseguida, se purificaron los productos de las digestiones y se resuspendieron en agua miliQ.

Ligación del dominio I en pUC19

Se mezclaron los dominios I con el pUC19 en una proporción 10:1 inserto:vector, y se agregó 0.5 unidades de enzima ligasa del fago T4. Se incubaron a 4°C por 16 h. La reacción se detuvo colocándola 10 min a 65°C (se ha reportado que esto aumenta la eficiencia de transformación de *Ec*, Ymer, 1991). La mezcla de ligación se usó para transformar células competentes de *Ec* BL21.

Selección de las clonas recombinantes

Las colonias resistentes a ampicilina se levantaron con palillos estériles, se inocularon cinco clonas juntas en tres ml de caldo LB con ampicilina y a la vez se ordenaron en agar LB con antibiótico. De cada cultivo compuesto por cinco clonas (pool), se aislaron plásmidos por el método de lisis alcalina. Los plásmidos se observaron en un gel de agarosa, comparando su patrón de bandas de ADN superenrollado con el del plásmido pUC19 sin inserto. Aquéllos "pools" que tuvieron bandas adicionales a las del vector fueron tomados en consideración, para inocular las clonas de las que provinieron en forma individual en otros tres ml de caldo LB con ampicilina.

Se purificaron los plásmidos de cada clona y se corrió un gel de agarosa para comparar el patrón de bandas de ADN superenrollado con el del vector sin inserto. Las clonas que tuvieron plásmidos con un patrón de bandas de mayor tamaño que el vector, fueron seleccionadas para ser purificadas y caracterizadas con enzimas de restricción. Los plásmidos de cada clona seleccionada fueron digeridos con *HindIII* y *BamHI* y las que dieron el patrón de restricción esperado, se sembraron en agar LB con ampicilina y se guardaron en refrigeración hasta su uso.

Reconstrucción de los genes nativos

Unión del dominio II y III

Los dominios II y III de ambos genes fueron digeridos con la enzima *BglII*, purificados por extracción fenol:cloroformo, visualizados en un gel de agarosa y unidos con ligasa de T4 en una proporción 1:1. Durante este proceso se ligaron los dominios II y III de cada gen.

PCR de la unión dominio II-dominio III

Para tener mayor cantidad de ADN, se efectuaron PCR para amplificar las uniones construidas. Para la unión de los dominios de *cry1Ac1* se usaron los oligos ZJ6 y ZJ10, para *cry3Aa1* los oligos LD2 y LD6. Las PCR fueron verificadas en un gel de agarosa y purificadas por extracción fenol:cloroformo.

Preparación del ADN vector y del inserto

pUC19 con el dominio I insertado fue aislado y purificado con fenol:cloroformo para usarlo como vector en la clonación de los dominios II y III. Las uniones dominios II-III y el plásmido fueron digeridas con *Bam*HI y *Kpn*I. Después de comprobar las digestiones, el ADN se purificó con fenol:cloroformo.

Construcción de los genes completos

Las uniones dominio II-III se ligaron con el vector, en una proporción 10:1 inserto:vector, de tal forma que se obtuvieron los genes *cry1Ac1* y *cry3Aa1* reconstruidos. El volumen final de ligación fue de 15 μ l y la ligasa se inactivó por calor a 65°C. Con esta mezcla se transformó *Ec* BL21 competentes según como se mencionó antes.

Selección de clonas recombinantes

Se efectuó como se describió anteriormente. Los plásmidos de cada clona seleccionada fueron digeridos con *Bgl*II. Los plásmidos que se linearizaron y tuvieron un peso mayor al vector linearizado, según se observó en un gel de agarosa, fueron digeridos con *Bam*HI y sólo las clonas que dieron el patrón de restricción esperado, se sembraron en agar LB con ampicilina y se guardaron en refrigeración. De esta forma se obtuvieron clonas con los genes *cry1Ac1* y *cry3Aa1* reconstruidos con sus tres

dominios delimitados por sitios únicos de restricción. Los plásmidos recombinantes portadores de estos genes fueron llamados pCR y pTR, respectivamente.

Construcción y Clonación de los genes quiméricos

Para realizar los intercambios entre los dominios se purificaron grandes cantidades de los plásmidos pCR y pTR por el método de lisis alcalina a gran escala seguida de extracción fenol:cloroformo.

Para intercambiar recíprocamente cada dominio, los plásmidos fueron digeridos con enzimas apropiadas en cada caso. Por ejemplo, para el intercambio del dominio I, los plásmidos fueron digeridos con las enzimas *HindIII* y *BamHI*, los fragmentos de tamaño correcto correspondientes a cada dominio (900 pb para *cry1Ac1* y 1500 pb para *cry3Aa1*) fueron fraccionados en geles preparativos de agarosa y purificados por medio del GeneClean Kit II.

Los fragmentos purificados fueron ligados en el resto de los plásmidos pCR y pTR (sin el dominio I), que fueron previamente purificados de manera similar. Los plásmidos recombinantes generados fueron introducidos en *Ec BL21* por electroporación y las clonas fueron seleccionadas por análisis de restricción de sus plásmidos aislados.

De manera semejante se procedió para el intercambio de los dominios II y III. Se obtuvieron clonas con los intercambios de los dominios entre ambos genes y sus plásmidos fueron denominados pCT1 (construcción TCC, donde cada posición, de izquierda a derecha, indica la identidad de los dominios -I, II o III- y cada letra, el origen -C, por *cry1Ac1* y T por *cry3Aa1*) pCT2 (construcción CTC), pTC1 (CTT) y pTC3 (TTC). Las construcciones TCT y CCT no fue posible obtenerlas.

Clonación de las quimeras de Cry1Ac1 y Cry3Aa1 en Bt

Clonación de los genes quiméricos en pHT315

Los plásmidos pCT1, pCT2, pTC1 y pTC3 fueron digeridos con las enzimas *KpnI* y *HindIII* para purificar los fragmentos de ADN correspondientes a los genes quiméricos. Los fragmentos del tamaño esperados fueron purificados por electroforesis en gel preparativo de agarosa de bajo punto de fusión. El plásmido pHT315 fue también digerido con *KpnI* y *HindIII* a fin de generar extremos cohesivos que permitieran su ligación a los fragmentos génicos aislados.

Después de una reacción de ligación de los fragmentos purificados y el vector pHT315, la cepa de *Ec* DH5a fue transformada por separado con las diferentes mezclas de ligación. Las clonas recombinantes fueron seleccionadas por resistencia a ampicilina en medio LB en presencia de X-gal e IPTG.

Los plásmidos de estas clonas fueron aislados, purificados y digeridos con *KpnI/HindIII* o *XhoI/HindIII* para corroborar la presencia de plásmidos recombinantes. Los plásmidos construidos fueron denominados pHCT1, pHCT2, pHTC1 y pHTC3.

Transformación de Bt 407.

Un cultivo joven de la cepa Bt 407 se creció en caldo infusión cerebro-corazón hasta la mitad de la fase logarítmica. Se colectaron las células por centrifugación y se lavaron con agua. Las células se resuspendieron en polietilenglicol 6000 al 40%. 100 μ l de las células se mezclaron con 5-10 μ l de DNA de los plásmidos pHCT1, pHTC1, pHCT2 o pHCT3 en una celda para electroporar de 0.4 cm de diámetro y se aplicó un pulso de 2.5 kV a 25 μ F con una resistencia de 1000 Ω usando el equipo GenePulser (BioRad, Hercules CA USA)

Las células se sembraron en agar LB con eritromicina (5 µg/ml) y se incubaron por 12 h. Se seleccionaron algunas colonias resistentes al antibiótico y sus plásmidos fueron extraídos y analizados por digestión con enzimas de restricción. De esta forma se obtuvieron clonas de Bt con los plásmidos recombinantes. Dichas clonas se denominaron CT1, CT2, TC1 y TC3, de acuerdo a las construcciones contenidas en cada una de ellas.

Análisis de la expresión de los genes mutantes.

Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de las cepas mutantes

Las cepas que contenían los genes mutantes fueron crecidas en caldo LB con ampicilina (en el caso de Ec) o caldo SP con eritromicina (Bt) por una noche a 37°C y se les hizo una electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS (Laemli y Favre, 1973). El patrón de proteínas fue visualizado por tinción de Bradford (Bradford, 1976).

Inmunodetección de las proteínas recombinantes

Geles de poliacrilamida-SDS con las proteínas recombinantes producidas en Ec se transfirieron a filtros de nitrocelulosa y se detectó la presencia de las proteínas recombinantes de cada clona usando como primer anticuerpo anticuerpos policlonales obtenidos en conejo. Para Cry1Ac1 se usó un anticuerpo contra esta toxina purificada a partir de *B. thuringiensis* HD-73, mientras que para Cry3Aa1 se usó un anticuerpo dirigido contra esa toxina obtenida de *B. thuringiensis tenebrionis* (Btt). Como segundo anticuerpo se usó un conjugado anti-IgGconejo-fosfatasa alcalina. La detección se llevó a cabo con los sustratos de la enzima NBT (Nitroazul de Tetrazolio) y BCIP (bromo-cloro-indoifosfato) (Sigma Chemical Co.)

Digestión de las toxinas quiméricas con tripsina

Las clonas transformantes de Bt se crecieron en clado SP con eritromicina hasta la fase de esporangio tardío (3-4 días). Los esporangios se lavaron con agua y se lisaron mediante tratamiento con lisozima (10 mg/mL), congelamiento a -70°C y sonicación. Después de centrifugar, el precipitado fue resuspendido en Tris 0.1 M pH 8.6 y se cuantificó proteína total por el método de Bradford leyendo absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 620

Los extractos de proteína total así obtenidos se trataron con tripsina en una relación 1:20 por 2 h a 37°C. Al cabo de este tiempo, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de los extractos digeridos y las proteínas fraccionadas se visualizaron por tinción con azul Coomasie.

Bioensayos

Se prepararon soluciones de los extractos de proteína total de las diferentes clonas y se aplicaron uniformemente en un volumen de 80 mL sobre copas de plástico conteniendo dieta artificial para larvas de *T. ni*. La concentración final fue de 10 µg/cm² de dieta. Se permitió que se secaran las copas y se infestaron 25 copas con larvas neonatas por cada tratamiento y control (una larva por copa). Las copas cerradas se colocaron en bolsas de papel selladas y se incubaron a temperatura ambiente por 7 días.

Después del periodo de incubación, se contaron las larvas vivas, muertas y perdidas para cada tratamiento y control y se registró el porcentaje de mortalidad. En total se realizaron tres bioensayos independientes.

Tabla 3. Tamaño de las regiones codificantes de los dominios de los genes *cry1Ac1* y *cry3Aa1*.

RESULTADOS

Mutagénesis dirigida al sitio:

Las regiones que codifican para cada dominio de las toxinas Cry1Ac1 y Cry3Aa1 fueron amplificadas por PCR. Los oligonucleótidos diseñados introdujeron cambios puntuales en las secuencias de los genes que dieron origen a sitios únicos para enzimas de restricción. Los resultados revelan que fue posible amplificar con éxito cada dominio, con la consecuente generación de los sitios de restricción apropiados. En la Figura 2 se observan los productos únicos de los fragmentos amplificados, mismos que corresponden a los tamaños esperados (Tabla 3)

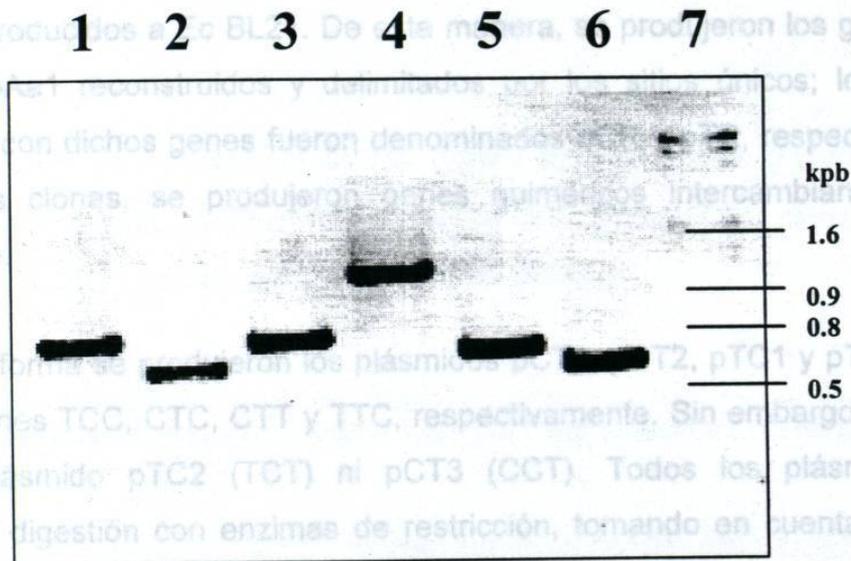


Figura 2. Productos amplificados por PCR de las regiones codificantes de los dominios de Cry1Ac1 y Cry3Aa1. Carriles: 1-3, dominios 1, 2 y 3 de Cry1Ac1; 4-6, dominios 1, 2 y 3 de Cry3Aa1; 7, marcador de talla molecular (λ digerido con *Hind* III y *Eco* RI)

Tabla 3. Tamaño de las regiones que codifican para los dominios de los genes *cry1Ac1* y *cry3Aa1*.

| Dominio (gen) | Tamaño esperado (pb) |
|----------------------|----------------------|
| 1 (<i>cry1Ac1</i>) | 872 |
| 2 (<i>cry1Ac1</i>) | 620 |
| 3 (<i>cry1Ac1</i>) | 800 |
| 1 (<i>cry3Aa1</i>) | 1427 |
| 2 (<i>cry3Aa1</i>) | 633 |
| 3 (<i>cry3Aa1</i>) | 550 |

Reconstrucción de los genes nativos y generación de genes quiméricos

Los fragmentos amplificados correspondientes a cada dominio fueron clonados en pUC19 e introducidos a *Ec* BL21. De esta manera, se produjeron los genes nativos *cry1Ac1* y *cry3Aa1* reconstruidos y delimitados por los sitios únicos; los plásmidos recombinantes con dichos genes fueron denominados pCR y pTR, respectivamente. A partir de estas clonas, se produjeron genes quiméricos intercambiando dominios recíprocamente.

De esta forma se produjeron los plásmidos pCT1, pCT2, pTC1 y pTC3 portando las construcciones TCC, CTC, CTT y TTC, respectivamente. Sin embargo, no pudimos construir el plásmido pTC2 (TCT) ni pCT3 (CCT). Todos los plásmidos fueron analizados por digestión con enzimas de restricción, tomando en cuenta el mapa de restricción de cada gen y de los vehículos (ver Apéndice B).

En la Figura 3 se observa una electroforesis en gel de agarosa, donde se aprecia que los tamaños de los fragmentos producidos por los cortes enzimáticos correspondieron a lo esperado de acuerdo a los mapas de restricción (Tabla 4).

Subclonación de los genes quiméricos en Bt

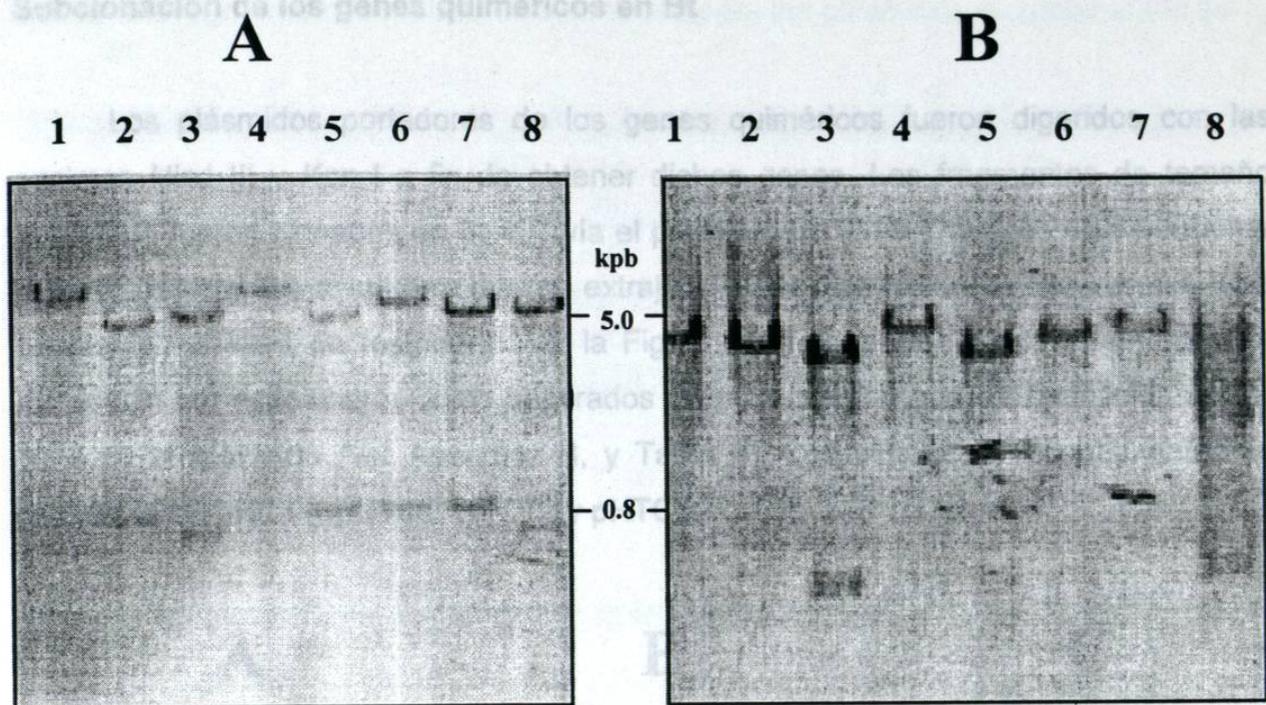


Figura 3. Análisis de restricción de los genes reconstruidos y quiméricos con *Eco RV* (Panel A) e *Hind III* (Panel B). Carriles 1-9, pTR, pTC1, clona negativa de pTC2, pTC3, pCR, pCT1, pCT2, clona negativa de pCT3.

Tabla 4. Fragmentos de restricción esperados para las diferentes construcciones realizadas.

| Plásmido | Fragmentos esperados (pb)* | |
|----------|----------------------------|------------------|
| | con <i>Eco RV</i> | con <i>Sac I</i> |
| pTR | 5256 | 5256 |
| pTC1 | 784, 3927 | 4703 |
| pTC3 | 5554 | 5554 |
| pCR | 816, 4127 | 832, 4120 |
| pCT1 | 816, 4717 | 832, 4667 |
| pCT2 | 874, 4127 | 5058 |

* Los plásmidos con el dominio 1 incluyen 2659 (Cry1Ac1) o 2648 (Cry3Aa1) pb de pUC19.

Subclonación de los genes quiméricos en Bt

Los plásmidos portadores de los genes quiméricos fueron digeridos con las enzimas *Hind* III y *Kpn* I a fin de obtener dichos genes. Los fragmentos de tamaño apropiado fueron clonados en Bt 407 vía el plásmido pHT315. Después de seleccionar colonias resistentes a eritromicina, se extrajo el ADN plasmídico de las mismas y se efectuó un análisis de restricción. En la Figura 4 se observa que los fragmentos de restricción correspondieron a los esperados de acuerdo al mapa de restricción de los genes y el plásmido (ver Apéndice B, y Tabla 5). Los plásmidos recombinantes se denominaron pHCT1, pHTC1, pHCT2 y pHTC3.

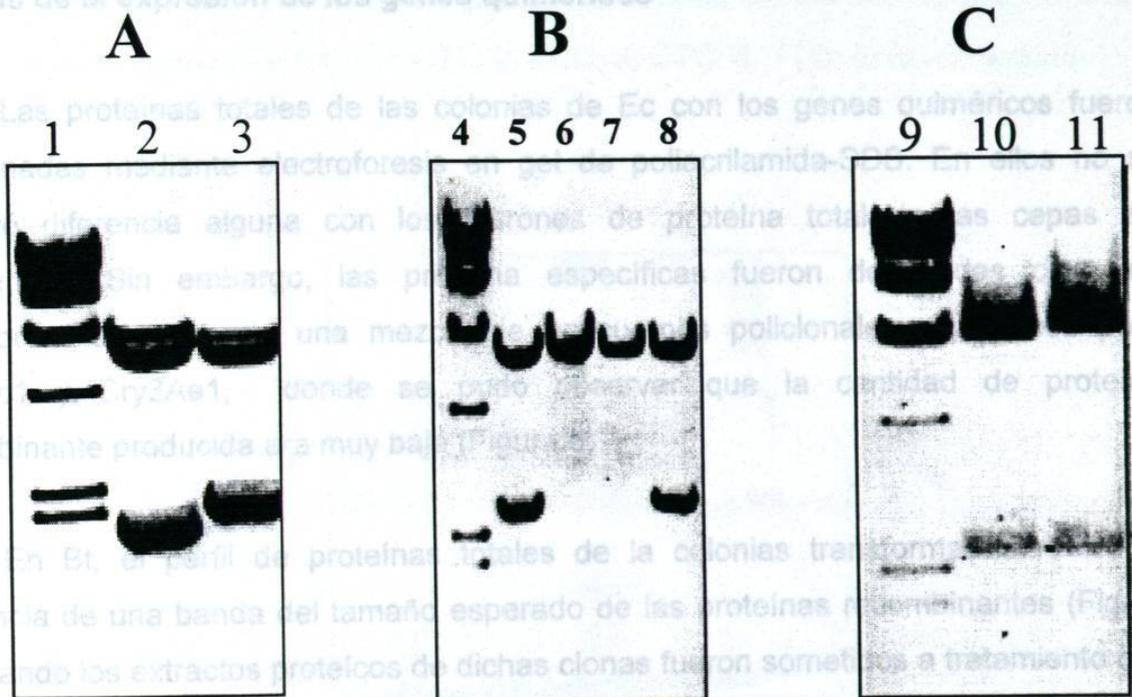


Figura 4. Análisis de restricción con *Hind* III - *Kpn* I (Paneles A y B) o *Xho* I - *Hind* III (Panel C) de los plásmidos recombinantes en Bt 407. Carriles: 1, 4 y 9, marcador de talla molecular (fago lambda digerido con *Hind* III); 2, pHTC1; 3, pHCT2; 5 y 10, pHCT1; 6 y 7, pHT315; 8 y 11, pHTC3.

Tabla 5. Fragmentos de restricción esperados para los plásmidos recombinantes de Bt.

| Plásmido | Fragmentos esperados (pb) | |
|----------|------------------------------------|---------------------------------|
| | con <i>Hind</i> III - <i>Kpn</i> I | con <i>Xho</i> I - <i>Kpn</i> I |
| pHT315 | ca. 6500 | N.R. |
| pHCT1 | 2806, ca. 6500 | 2454, ca. 6852 |
| pHCT2 | 2344, ca. 6500 | N.R. |
| pHTC1 | 2072, ca. 6500 | N.R. |
| pHTC3 | 2834, ca. 6500 | 2482, ca. 6852 |

N.R. : No Realizada

Análisis de la expresión de los genes quiméricos

Las proteínas totales de las colonias de *Ec* con los genes quiméricos fueron fraccionadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. En ellos no se observó diferencia alguna con los patrones de proteína total de las cepas sin transformar. Sin embargo, las proteína específicas fueron detectadas con una inmunodetección usando una mezcla de anticuerpos policlonales específicos para Cry1Ac1 y Cry3Aa1, donde se pudo observar que la cantidad de proteína recombinante producida era muy baja (Figura 5).

En Bt, el perfil de proteínas totales de la colonias transformadas reveló la presencia de una banda del tamaño esperado de las proteínas recombinantes (Figura 9). Cuando los extractos proteicos de dichas clonas fueron sometidos a tratamiento con tripsina, una banda de alrededor de 66 kDa resultó resistente a la proteólisis (Figura 10). Esto indica que las proteínas recombinantes son producidas de manera estable en Bt ; aunque cabe mencionar que si los extractos se obtenían de células esporuladas y lisadas, o eran solubilizados antes del tratamiento proteolítico, ninguna banda era obtenida (datos no mostrados)

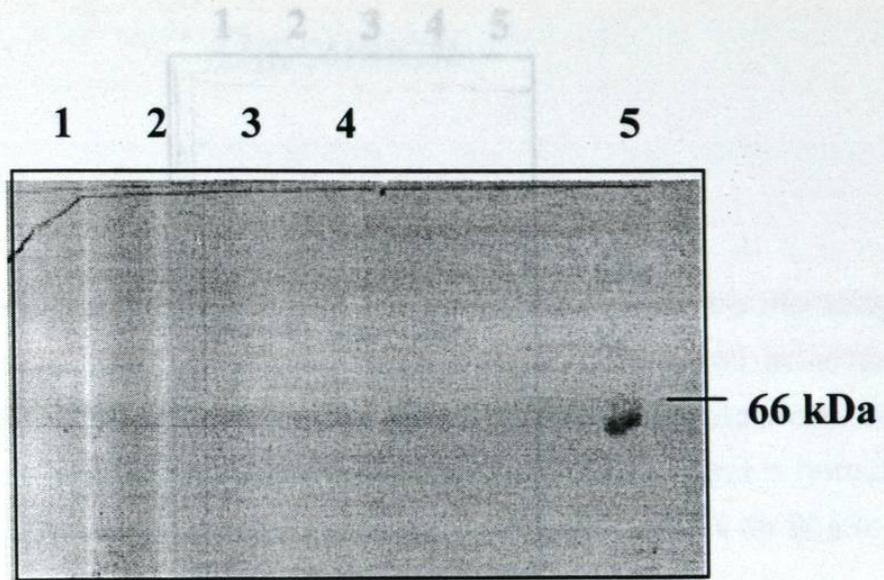


Figura 5. Inmunodetección de las proteínas totales de las clonas de Ec BL21 recombinantes. Carriles : 1, CTT; 2, TCC; 3, CTC; 4, TTC; 5, *Bt tenebrionis*.

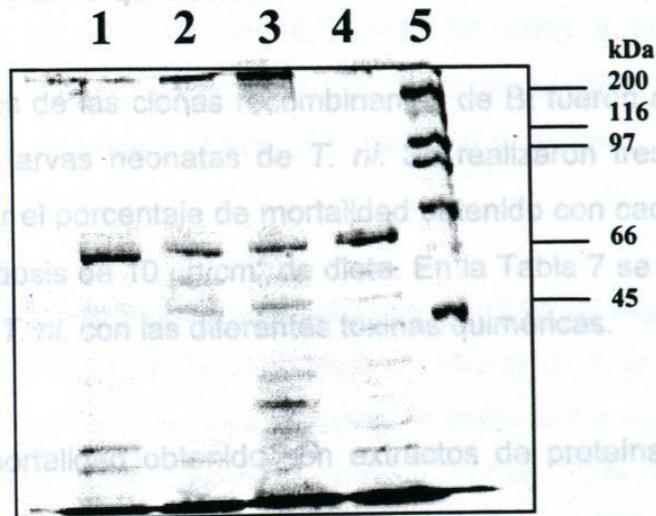


Figura 6. Perfil de proteínas de las clonas de Bt 407 con los genes quiméricos.

Carriles: 1, CTC; 2, TTC; 3, CTT; 4, TTC; 5, marcadores de masa molecular (miosina, β -galactosidasa, fosforilasa B, albúmina sérica, ovoalbúmina de arriba a abajo).

| Clon | 0 | 4 | 4 | 2.7 |
|------|----|----|----|------|
| CTT | 0 | 4 | 4 | 2.7 |
| CTC | 32 | 24 | 36 | 32.7 |
| TTC | 58 | 52 | 56 | 58.7 |

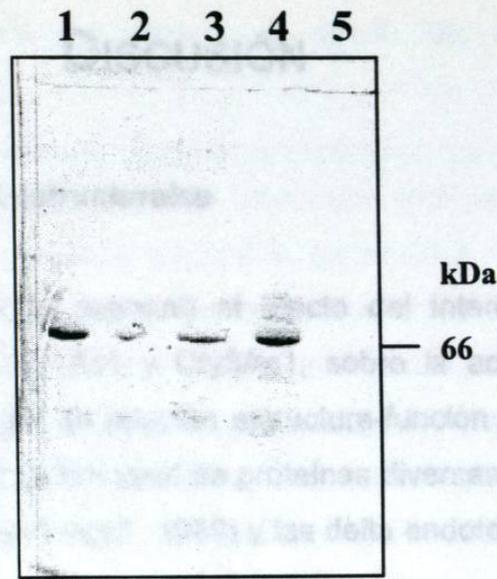


Figura 7. Patrón de proteínas total de las clonas recombinantes de Bt 407 tratados con tripsina. Carriles: 1, CTC; 2, CCT; 3, CTT; 4, TCC; 5, Bt 407.

Actividad biológica de las toxinas quiméricas

Los extractos proteicos de las clonas recombinantes de Bt fueron evaluados en cuanto a su toxicidad para larvas neonatas de *T. ni*. Se realizaron tres bioensayos independientes para registrar el porcentaje de mortalidad obtenido con cada una de las toxinas quiméricas, usando dosis de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de dieta. En la Tabla 7 se muestran los resultados de mortalidad de *T. ni*, con las diferentes toxinas quiméricas.

Tabla 6. Porcentaje de mortalidad obtenido con extractos de proteína total de las clonas recombinantes de Bt 407.

| Cepa | Bioensayo 1 | Bioensayo 2 | Bioensayo 3 | Promedio |
|------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| Bt 407 | 4 | 0 | 0 | 1.3 |
| HD73 (CCC) | 100 | 96 | 100 | 98.7 |
| Btt (TTT) | 0 | 4 | 0 | 1.3 |
| TCC | 96 | N.R. | 84 | 90 |
| CTT | 0 | 4 | 4 | 2.7 |
| CTC | 32 | 24 | 36 | 30.7 |
| TTC | 68 | 52 | 56 | 58.7 |

N.R.: No Realizado

DISCUSIÓN

Delimitación de los dominios estructurales

En el presente trabajo se examinó el efecto del intercambio homólogo de dominios estructurales entre Cry1Ac1 y Cry3Aa1, sobre la actividad insecticida de dichas proteínas. Esta estrategia de relación estructura-función de proteínas, ha sido usada ampliamente en el análisis funcional de proteínas diversas, como la hormona de crecimiento humano (Cunningham *et al.*, 1989) y las delta endotoxinas de Bt (Ge *et al.*, 1989; Liang y Dean. 1994).

Para realizar los intercambios a nivel génico, fue necesario realizar una comparación a nivel de estructura primaria y secundaria con Cry3Aa1, que nos permitiera definir cada dominio en la primera. De esta forma, se dedujo la extensión de los límites hipotéticos para los dominios de Cry1Ac1. En base a los resultados, diseñamos los oligonucleótidos mutagénicos. Las regiones codificantes de cada dominio fueron delimitadas mediante sitios de restricción únicos, creados por mutagénesis sitio-dirigida vía PCR.

Existen otros reportes donde se han realizado intercambios de segmentos entre toxinas Cry1 o Cry2, o experimentos de mutagénesis sitio-dirigida en las mismas, tratando de conocer el papel de las diferentes regiones en el mecanismo de acción (Ge *et al.*, 1989; Widner y Whiteley. 1990; Lee *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 1994; Liang y Dean. 1994; Schnepf *et al.*, 1990; Wu y Aronson. 1992; Aronson *et al.*, 1995; Bosch *et al.*, 1994 y Smith y Ellar. 1994). Extrañamente, pocos trabajos de este tipo centrados en Cry3Aa1, han aparecido en la literatura (Wu y Dean. 1996)

No obstante, al carecer de la estructura tridimensional de alguna proteína Cry1, en dichos trabajos fue necesario apoyarse únicamente en comparaciones de estructura primaria y/o secundaria con Cry3Aa1, para la delimitación de los dominios (Hodgman y

Ellar. 1990). Esto, obviamente, incrementó el grado de incertidumbre en la interpretación de los resultados.

A fines de 1995, fue publicada la estructura tridimensional de Cry1Aa1 (Grochulski *et al.*, 1995), que comparte un 84.2 % de similitud en estructura primaria con Cry1Ac1, lo que permitió tener acceso a un marco de referencia más confiable para verificar la delimitación de los dominios de Cry1Ac1. Al comparar la extensión teórica de los dominios de Cry1Ac1 según lo determinado en este trabajo (dominio I: aminoácidos 24-249, dominio II: 258-455 y dominio III: 463-609) con la extensión de los dominios de Cry1Aa1 determinado por cristalografía (dominio I: 33-250, dominio II: 258-457 y dominio III: 463-609), resultó evidente que la base teórica empleada para la delimitación de los dominios en este trabajo fue esencialmente correcta.

Intercambio de los dominios

Las regiones codificantes de los dominios fueron clonadas en *Ec* vía pUC19 para reconstruir los genes nativos. Se emplearon los sitios de restricción recién creados para unir los extremos de estas regiones de forma adecuada, de manera que los plásmidos recombinantes pCR y pTR contuvieron los genes *cry1Ac1* y *cry3Aa1*, respectivamente. Esta estrategia permitió realizar intercambios de dominios de forma muy precisa, sin recurrir a sitios de restricción naturales o a la recombinación *in vivo*, que han sido usados en otros trabajos (Ge *et al.*, 1989; Schnepf *et al.*, 1990; Widner y Whiteley. 1990; Caramori *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1992; Liang y Dean. 1994; Bosch *et al.*, 1994).

La principal desventaja de estos métodos de intercambio, es que regiones no pertenecientes a un determinado dominio pueden ser acarreadas junto con el mismo, lo cual dificulta la correlación concisa de la función con la estructura del dominio. Además, como se mencionó anteriormente, no fue sino hasta 1995 cuando se obtuvo la estructura terciaria de Cry1Aa1, lo que impidió la delimitación precisa de los dominios en los reportes anteriores.

Así, en el presente trabajo, por contar con el respaldo de la estructura tridimensional de Cry1Aa1 y por haber generado sitios de restricción por mutagénesis en los extremos de las regiones codificantes de los dominios, es un hecho seguro que al intercambiar las regiones génicas, fueron intercambiados dominios estructurales íntegros y delimitados con precisión.

Las construcciones génicas obtenidas fueron TCC, CTT, CTC y TTC, contenidas en los plásmidos pCT1, pTC1, pCT2 y pTC3, respectivamente. Las construcciones TCT y CCT no pudieron generarse, lo cual es intrigante, ya que se usaron varias estrategias de ingeniería genética con el objetivo de conseguirlo (datos no mostrados). Actualmente, desconocemos las causas del por qué no pudieron obtenerse.

Expresión de los genes quiméricos

Los genes quiméricos fueron colocados bajo el control de sus propios promotores transcripcionales y bajo el promotor *lac* de *Ec* presente en pUC19. Al analizar la producción de las proteínas recombinantes, se encontraron niveles muy bajos de las mismas (ver Figura 5). En un principio, esto se pudo deber a dos causas: 1) a un pobre nivel de transcripción ya que, tanto los promotores naturales de *Bt* para transcripción en *Ec*, como el promotor *lac* son considerados como débiles (Schnepf y Whiteley. 1981; Ge *et al.*, 1990); 2) a una inestabilidad frente a la proteólisis; aunque usamos la cepa de *Ec* BL21 con genotipo *lon⁻*, disminuida en proteasas intracelulares. (Studier y Moffatt. 1986), y esto permite descartar un incremento en la sensibilidad a proteasas por un plegamiento no adecuado en un ambiente heterólogo (Almond y Dean. 1993a y b; Vázquez-Juárez. 1997). Sin embargo, en este trabajo no se ahondó en investigar cuál fue la razón precisa de la baja expresión de las toxinas quimeras en *Ec*.

Dado lo anterior, se realizó la subclonación de los genes quiméricos en una cepa de *Bt* acristalífera (*Bt* 407), que ha sido manipulada con el fin de lograr la expresión de genes de *Bt* en un hospedero homólogo (Lereclus *et al.*, 1989). Para esto se empleó el

plásmido pHT315, el cual es un vehículo de clonación tipo "transbordador" o *shuttle*, ya que posee orígenes de replicación para Bt y Ec (Arantes y Lereclus. 1991).

Así, los genes clonados en Bt fueron analizados en cuanto a su expresión en este hospedero. Cuando las clonas recombinantes de Bt 407 se hicieron crecer en caldo SP hasta esporulación, no fue posible recuperar las proteínas quiméricas, pero cuando el cultivo creció hasta la fase de esporangio tardía, poco antes de la lisis, pequeños cristales amorfos se observaron en el citoplasma, junto con la espora (datos no mostrados).

Estos cristales pudieron ser recuperados por lisis artificial de las células y centrifugación, y sus proteínas fueron visualizadas en electroforesis en poliacrilamida-SDS (Figura 6). Al intentar solubilizar las toxinas y activarlas por digestión enzimática con tripsina, se observó una *proteólisis extensa de las mismas* (datos no mostrados). No obstante, cuando la digestión se efectuó con proteína no solubilizada, se verificó la producción de un fragmento resistente y soluble de una masa aproximada de 66 kDa (Figura 7).

Esta banda del tamaño esperado para las proteínas Cry quiméricas (masa molecular teórica promedio de 65 kDa), no se presentó en los extractos de células de Bt 407 sin transformar. Esto indica claramente que las proteínas quiméricas, aunque presentaron una sensibilidad aumentada a las proteasas de Bt, fueron producidas en forma estable, a diferencia de lo ocurrido en Ec; y que, por lo tanto, el plegamiento de las proteínas es considerablemente aceptable, aunque quizá algo distinto al nativo. Es digno de notar que en otros trabajos se ha reportado la producción de proteínas Cry quiméricas altamente sensibles a proteasas que incluso no pueden ser recuperadas en forma alguna (Chen *et al.*, 1993; Almond y Dean. 1993 a, b).

Participación de los dominios en la actividad insecticida

Sin duda alguna, los resultados más relevantes del presente trabajo, son los relacionados con la toxicidad de las proteínas quiméricas hacia larvas neonatas de *T. ni*, ya de ellos pueden desprenderse observaciones importantes acerca del rol de cada dominio en la actividad tóxica.

Como se observa en la Tabla 6, la cepa Btt (productora de Cry3Aa1 nativa) fue atóxica (mortalidad del 1.3%), lo cual es consistente con el hecho de que esta toxina es efectiva principalmente contra el coleóptero *Leptinotarsa decemlineata* (Sekar *et al.* 1987 y Hofte *et al.* 1987). La cepa Bt *kurstaki* HD-73 (productora de Cry1Ac1 nativa), de acuerdo a lo esperado, fue altamente tóxica (98.7% de mortalidad); considerando que la dosis empleada ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) fue muy superior a la CL_{50} reportada para este insecto, que es de $320 \text{ ng}/\text{cm}^2$ (Estada y Ferré. 1994).

Dominio I

En cuanto al intercambio del dominio I, se observa que la construcción TCC mantiene aproximadamente el mismo nivel de mortalidad (90%), que la toxina Cry1Ac1 nativa (CCC). De igual forma, la toxina CTT es prácticamente igual de atóxica (2.7%), que Cry3Aa1 nativa (TTT).

Esto confirma contundentemente que el dominio I por sí mismo es incapaz de alterar la especificidad de una determinada toxina y que por lo tanto, su participación en la actividad global debe estar dada a otro nivel, por ejemplo, en la formación de poros transmembranales (Ahmad y Ellar. 1990; Schnepf *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1991; Gazit y Shai. 1993; Gazit *et al.*, 1994; Von Tersch *et al.*, 1994; Gazit y Shai. 1995; Aronson *et al.*, 1995; Grochulski *et al.*, 1995; Jiménez-Salas. 1997).

Dominio II

Con respecto a la construcción CTC, se observa que la mortalidad obtenida disminuyó considerablemente (30.7%), con respecto a la toxina CCC. Esto sugiere inmediatamente, que el dominio II, al ser removido y sustituido por otro muy distinto, alteró significativamente la especificidad hacia el hospedero.

Esto concuerda plenamente con las observaciones que indican que la posible función del dominio II, dadas sus características, es el reconocimiento de los receptores intestinales en los insectos susceptibles (Ge *et al.*, 1989; Schnepf *et al.*, 1990; Widner y Whiteley. 1990; Lee *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 1994; Liang y Dean. 1994; Smith y Ellar. 1994; Rajamohan *et al.*, 1995, 1996; Wu y Dean. 1996; Jiménez-Salas. 1997).

Específicamente, en el caso de *T. ni*, se ha reportado que la región comprendida entre los aminoácidos 332-447 (incluida enteramente dentro del dominio II), es crucial para la especificidad de Cry1Ac1 contra este insecto (Schnepf *et al.*, 1990).

Así, la interpretación de estos resultados sería la siguiente: la construcción CTC, al carecer del dominio II, fue incapaz de unirse apropiadamente a los receptores localizados en el epitelio intestinal (Van Rie *et al.*, 1989, 1990a), con lo cual, el daño a la membrana se vio considerablemente disminuido, y por ende, la mortalidad. No obstante, la mortalidad residual es apreciablemente alta como para considerar a esta proteína como atóxica (compárese con el % de mortalidad de TTT o CTT).

Surgen dos posibles explicaciones razonables a este respecto: 1) que la toxina se inserte espontáneamente en ausencia de unión al receptor, debido a la alta concentración en que se encontró (Yunovitz y Yawetz. 1988; Slatin *et al.*, 1990) ó; 2) que la mortalidad observada se deba a una unión residual al receptor menos efectiva, con la participación de otros dominios (Bosch *et al.*, 1994). Los resultados obtenidos con el dominio III, discutidos más adelante, apoyan la segunda sugerencia.

Dominio III

Los resultados más interesantes se desprenden de la evaluación de la toxicidad de la construcción TTC. El valor considerablemente alto de mortalidad (58.7%) registrado con esta toxina con respecto a TTT, indica que el dominio III está implicado en los eventos relacionados con la especificidad. Esto ha sido sugerido con anterioridad en otros trabajos (Bosch *et al.*, 1994; Aronson *et al.*, 1995), donde se ha mencionado que algunas regiones del dominio III (aminoácidos 500-509), cercanas al dominio II, podrían participar en la unión reversible inicial y específica hacia los receptores.

La interpretación de estos resultados confirma que el dominio III podría poseer alguna capacidad para unirse a los receptores, quizá reconociendo regiones distintas, pero cercanas, a las reconocidas por el dominio II. Así, la especificidad depende de la presencia tanto del dominio II como del III, para un despliegue completo de la toxicidad.

Queda por explicar el por qué se registró una mortalidad mayor con la construcción TTC que con la CTC. Es posible que la toxina CTC posea un plegamiento considerablemente más desviado del nativo que la TTC, por el hecho de poseer una inserción estructural hacia el centro de la molécula. Esto podría ser responsable de profundos cambios conformacionales que impidieran una unión eficiente del dominio 3 con los receptores.

Es bien conocido que los dominios interactúan entre sí, mediante diversos tipos de fuerzas como puentes de hidrógeno, puentes salinos y efectos hidrofobos, y que dichas interacciones son importantes para la estabilidad estructural de las toxinas (Grochulski *et al.*, 1995). Por su misma arquitectura, estas interacciones se verían más afectadas en la proteína CTC que en la TTC.

En este punto, es posible sugerir un modelo para el mecanismo molecular de acción de las toxinas Cry: a) La toxina activa se une rápida y reversiblemente a los receptores intestinales, con la participación de los dominios II y III; posiblemente

reconociendo sitios distintos, pero espacialmente cercanos dentro de la molécula y actuando en forma cooperativa. b) Ocurre la inserción irreversible del dominio I en la membrana, posiblemente en respuesta a un cambio conformacional ocasionado por la unión al receptor.

En este modelo destaca la participación cooperativa de ambos, el dominio II y III, en la especificidad, a diferencia de lo reportado anteriormente donde se atribuía de forma excluyente esta capacidad al dominio II, al III o incluso al I (Wu y Aronson. 1992; Smith y Ellar. 1994; Bosch *et al.*, 1994; Aronson *et al.*, 1995; Wu y Dean. 1996)

Finalmente, surgen algunas preguntas interesantes ¿cuál sería la mortalidad con las construcciones TCT y CCT en lepidópteros? ¿Cuál sería el efecto de las toxinas contra el coleóptero *Leptinotarsa decemlineata*? Los resultados obtenidos nos permiten predecir que dichos bioensayos muy probablemente confirmarían nuestras conclusiones, pero la comprobación finalmente dependerá de la ejecución de los experimentos.

Así mismo, será de vital importancia realizar ensayos de unión a receptores (*ligand blotting*, inmunolocalización) y de formación de poro (interrupción en la corriente de corto circuito, del transporte de aminoácidos en vesículas, experimentos de *light scattering*) tanto en lepidópteros como coleópteros para conocer la capacidad de unión a receptor y formación de poro de las toxinas quiméricas, y poder conocer a detalle el efecto de los reemplazos.

Es seguro que las respuestas a éstas y otras preguntas enriquecerán grandemente las contribuciones aportadas por este trabajo, y ampliarán el conocimiento sobre el mecanismo de acción a nivel molecular de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*.

CONCLUSIONES

- 1) Las regiones codificantes de cada dominio de Cry1Ac1 y Cry3Aa1 fueron amplificadas exitosamente por PCR, a la vez que se introdujeron sitios únicos para enzimas de restricción.
- 2) Se construyeron los genes quiméricos *ctt*, *tcc*, *ttc* y *ctc*, los cuales fueron clonados en *Escherichia coli* y *Bacillus thuringiensis*.
- 3) La expresión de los genes quiméricos en *E. coli* resultó muy baja, probablemente debido a un nivel de transcripción disminuido.
- 4) La expresión de los genes quiméricos en *B. thuringiensis* fue significativamente alta, aunque los productos proteicos resultaron ser algo inestables frente a proteasas.
- 5) Las toxinas quiméricas pudieron ser recuperadas y procesadas proteolíticamente con tripsina para rendir un fragmento resistente de alrededor de 66 kDa.
- 6) Las proteínas CTT y TCC mostraron una actividad biológica semejante a las proteínas nativas TTT y CCC, respectivamente, lo que descarta la participación del dominio I en la especificidad hacia el insecto blanco.
- 7) La actividad biológica de la proteína CTC fue considerablemente menor que la de la nativa CCC, lo que hace responsable al dominio II de la especificidad.
- 8) La toxina TTC mostró una actividad insecticida mayor que la nativa TTT, lo cual sugiere que también el dominio III está involucrado en la especificidad.

LITERATURA CITADA

- Adang, M.J., M.J. Staver, T.A. Rocheleau, J. Leighton, R. F. Barker y D.V. Thompson. 1985. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene*. **36**:289-300.
- Agaisse H.D. y D. Lereclus. 1994. Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* CryIIIa toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a *spoOA* mutant. *J. Bacteriol.* **176**:4734-4741.
- Almond B.D. y D.H. Dean. 1993a. Structural stability of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin homolog-scanning mutants determined by susceptibility to proteases. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2442-2448.
- Almond B.D. y D.H. Dean. 1993b. Suppression of protein structure destabilizing mutations in *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by second site mutations. *Biochemistry*. **32**: 1040-1046
- Ahmad W. y D.J. Ellar. 1990. Directed mutagenesis of selected regions of a *Bacillus thuringiensis* entomocidal protein. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**: 97-104.
- Arantes O. y D. Lereclus. 1991. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene*. **108** :115-119.
- Aronson A. I., E.S. Han, W. McGaughey y D. Johnson. 1991. The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 981-986.

- Aronson A.I. 1993. The two faces of *Bacillus thuringiensis*: Insecticidal proteins and post-exponential survival. *Mol. Microbiol.* **7**:489-496.
- Aronson A.I., D. Wu y C. Zhang. 1995. Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. *J. Bacteriol.* **177** :4059-4065.
- Bauer L.S. 1992. Ultrastructural effects of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* on midgut cells of the cottonwood leaf beetle. *J. Invertbr. Pathol.* **60**: 15-25.
- Belfiore C.J., R.K. Vadlamudi, Y.A. Osman y L.A. Bulla Jr. 1994. A specific binding protein from *Tenebrio molitor* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **200**: 359-364.
- Bietlot H.P., I. Vishnubhatla, P.R. Carey, M. Pozsgay y H. Kaplan. 1990. Characterization of the cysteine residues and disulfide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* **267**: 309-316.
- Bosch D., B. Schipper, H. Van der Kleij, R. A. de Maagd y W.J. Stiekema. 1994. Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. *Bio/tech.* **12**: 915-918.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bravo A. 1997. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains. *J. Bacteriol.* **179**: 2793-2801.
- Bravo A., K. Hendrickx, S. Jansens y M. Peferoen. 1992a. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to Lepidopteran and Coleopteran midgut membranes. *J. Invertebr. Pathol.* **60**: 247-253.

- Bravo A., S. Jansens y M. Peferoen. 1992b. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *J. Invertebr. Pathol.* **60**: 237-246.
- Bravo A. 1997. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains. *J. Bacteriol.* **179**: 2793-2801.
- Caramori T., A.M. Albertini y A. Galizzi. 1991. In vivo generation of hybrids between two *Bacillus thuringiensis* insect-toxin-encoding genes. *Gene.* **98**: 37-44.
- Cármenes R.S., J.P. Freije, M.M. Molina y J.M. Martín. 1989. Predict 7, a program for protein structure prediction. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **159**: 687-693.
- Cerón J., L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina y A. Bravo. 1994. PCR analysis of the cryI insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 353-356.
- Chen X. J., Lee M. K. Y D. H. Dean. 1993. Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombyx mori* midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90** : 9041 :9045.
- Chothia C. y A. G. Murzin. 1993. New folds for all- β proteins. *Current Biology.* **1**: 217-222.
- Crawford D.N. y W.R. Harvey. 1988. Barium and Calcium block *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* δ -endotoxin inhibition of potassium current across isolated midgut larval *Manduca sexta* *J. Exp. Biol.* **137**: 277-286.

- Crickmore N., D. R. Zeiger, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum y D. H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. and Mol. Biol.* **62** : 807-813.
- Cunningham B. C., P. Jharani, P. Ng y J. A. Wells 1989. Receptor and antibody epitopes in human growth hormone identified by homolog-scanning mutagenesis. *Science*. **243**: 1330-1336.
- Estada U. y J. Ferré. 1994. Binding of insecticidal Crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera : Nectuidae), and selection for resistance to the one of the Crystal proteins. *Appl. Environm. Microbiol.* **60**: 3840-3846.
- Feitelson J.S., J. Payne y L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. *Bio/tech.* **10**: 71-275.
- Garczynski S. F., J. W. Crim y M. J. Adang. 1991. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by protein blot analysis. *Appl. Environm. Microbiol.* **57**: 2816-2820
- Gazit E. y Y. Shai. 1993. Structural and functional characterization of the a5 segment of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Biochem.* **32**: 3429-3436.
- Ge A.Z., N.I. Shivarova y D.H. Dean. 1989. Location of the *Bombyx mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 4037-4041.
- Ge A.Z., R.M. Pfister y D.H. Dean. 1990. Hyperexpression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin-encoding gene in *Escherichia coli* : properties of the product. *Gene.* **93**: 49-54.

- Ge A.Z., D. Rivers, R. Milne y D.H. Dean. 1991. Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. Refinement of a *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* specificity domains on CryIA(c). *J. Biol. Chem.* **266**: 17954-17958.
- Grochulsky P., L.Manson, S. Borisova, M. Puzstai-Carey, J. L. Schwartz, R. Brousseau y M. Cygler. 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: Crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* **254** : 447-464.
- Haider M.Z., B. H. Knowles y D.J. Ellar. 1986. Specificity of *Bacillus thuringiensis* colmeri insecticidal δ -endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. *Eur. J. Biochem.* **156**: 531-540.
- Haider M.Z. y D.J. Ellar. 1987. Analysis of the molecular basis of insecticidal specificity of *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin. *Biochem. J.* **248**: 197-201.
- Haider M.Z. y D.J. Ellar. 1989a. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxin: interaction with phospholipid vesicles. *Bioch. Biophys. Acta.* **978**: 216-222.
- Haider M.Z. y D.J. Ellar. 1989b. Functional mapping of an entomocidal δ -endotoxin. Single amino acid changes produced by site-directed mutagenesis influence toxicity and specificity of the protein. *J. Mol. Biol.* **208**: 183-194.
- Hofmann C.H., H. Vanderbruggen, H. Höfte, J. Van Rie, S. Jansens y H. Van Mellaert. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxinis correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insects midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 7844-7848.

- Höfte H., H. de Greve, J. Seurinck, S. Jansens, J. Mahillon, C. Ampe, J. Vandekerckhove, H. Vanderbruggen, M. Van Montagu, M. Zabeau y M. Vaeck. 1986. Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* berliner 1715. *Eur. J Biochem.* **161** :273-280.
- Höfte H., J. Seurinck, A. Van Houtven y M. Vaeck. 1987. Nucleotide sequence of a gene encoding an insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* toxic against Coleoptera. *Nucleic Acids Res.* **15**: 7183.
- Höfte H. y H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**: 242-255.
- Innis M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky y T.J. White. 1990. PCR Protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, Inc. San Diego, Cal. U.S.A.
- Jiménez-Salas, Z. 1997. Identificación de las regiones que determinan la especificidad de la δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis*. Tesis Maestro en Ciencias. Fac. de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Monterrey, N. L. México. 90 p.
- Jonhson D.E., G.L. Brookhart, K.J. Kramer, B.D. Barnett y W.H. MacGaughey. 1990. Resistance to *Bacillus thuringiensis* by the indian meal moth, *Plodia interpunctella*: Comparison of midgut proteinases from susceptible and resistance larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **55**: 235-244.
- Knigh P.J.K., N. Crickmore y D.J. Ellar. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* **11**: 429-436.
- Knowles B.H. y D.J. Ellar. 1986. Characterization and partial purification of a plasma membrane receptor for *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* lepidopteran-specific δ -endotoxin. *J. Cell Sci.* **83**: 89-101.

- Knowles B.H. y D.J. Ellar. 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. *Bioch. Biophys. Acta.* **924**: 509-518.
- Knowles B.H. y J.A.T. Dow. 1993. The crystal δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanisms of action on the insect gut. *BioEssays* **15**: 469-476.
- Laemmli U.K. y M. Favre. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4.1. DNA packing events. *J. Mol. Biol.* **80**: 575-599.
- Lee M.K., R.E. Milne, A.Z. Ge y D.H. Dean. 1992. Location of a *Bombyx mori* receptor binding region on a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *J. Biol. Chem.* **267**: 3115-3121.
- Lereclus D., O. Arantes, J. Chaufaux y M. M. Lecadet. 1989. Transformation and expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **60**: 211-218.
- Lí J., J. Carroll y D.J. Ellar. 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature.* **353**: 815-821.
- Liang Y. Y H. D. Dean. 1994. Location of a lepidopteran specificity in insecticidal Crystal protein CryIIA from *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* **13**: 569-575
- Lorence Q. A. y Quintero R. R. 1996. Mecanismo molecular de acción de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. En: *Avances recientes de la biotecnología en Bacillus thuringiensis*. Editores: Galán W. L. J., Rodríguez P. C. y Luna O. H. U.A.N.L. Monterrey, México.

- Lu H., Rajamohan F. y D. H. Dean. 1994. Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* endotoxin CryIAa associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. *J. Bacteriol.* **176**: 5554-5559.
- Martin A. W. P. 1994. An iconoclastic view of *Bacillus thuringiensis* ecology. *American Entomol. Summer 1984.* 85-90 p.
- Mathavan S., P.M. Sudha y S.M. Pechimuthu. 1989. Effect of *Bacillus thuringiensis israelensis* on the midgut cells of *Bombyx mori* larvae: a histopathological and histochemical study. *J. Invertebr. Pathol.* **53**: 217-227.
- Meadows J., S.S. Gill y L.W. Bone. 1990. *Bacillus thuringiensis* strains affect population growth of the free-living nematode *Turbatrix aceti*. *Invertebr. Reprod. Dev.* **17**: 73-76.
- Mullis K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American.* April 1990. pp: 56-65.
- Nagamatsu Y., Y. Itai, C. Hatanaka, G. Funatsu y K. Hayashi. 1984. A toxic fragment from the entomocidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Agric. Biol. Chem.* **48**:611-619.
- Ogiwara K., L.S. Indrasith, S. Asano y H. Hori. 1992. Processing of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **60**: 121-126.
- Payne J.M., J.C.R. Cannon y A.L. Bagley. 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* isolates for controlling acarides. International Patent. Application number PCT/US92/03546. Publication Number WO 92/19106.

- Parker M.W., F. Pattus, A.D. Tucker y D. Tsernoglou. 1989. Structure of the membrane-pore forming fragment of colicin A. *Nature*. **337**: 93-96.
- Pereyra-Alfárez B. 1992a. Clonación, caracterización y manipulación del gen que codifica para la δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* cepas GM-7 y GM-10. Tesis doctoral. Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca Mor. Méx.
- Pereyra-Alfárez B., A. Bravo, R. Quintero y X. Soberón. 1992b. The d-endotoxin protein family displays a hydrophobic motif that might be implicated in toxicity. *Mol. Microbiol.* **6**: 2095-2098.
- Pereyra-Alfárez B., M. I. Cardenas, Z. J. Salas, G. R. C. Gómez, L.C. Damas Buenrostro y R. C. V. Juárez. 1996. Manual de laboratorio de Genética de microorganismos. 5a. edición. Depto. de Microbiología e Inmunología, Fac. de C. Biológicas, UANL. México.
- Prost E. y D. Larzul. 1989. The polymerase chain reaction and its applications. *Meth. Mol. Cel. Biol.* **1**:45-51.
- Raymond K.C., T.R. John y L.A. Bulla Jr. 1990. Larvicidal activity of chimeric *Bacillus thuringiensis* protoxins. *Mol. Microbiol.* **4**: 1967-1973.
- Ravoahangimalala O., J.F. Charles y J. Schoeller-Raccaud. 1993. Immunological localization of *Bacillus thuringiensis* toxins in midgut cells of intoxicated *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae). *Res. Microbiol.* **144**: 271-278.
- Rodríguez-Padilla. C., L. J. Galán-Wong y R. S. Taméz-Guerra. 1993. Catálogo internacional de Bacilos entomopatógenos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. F.C.B.-U.A.N.L. Monterrey, N.L. México.

- Sambrook J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual/second edition. Cold Spring Harbor N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sacchi V.F., P. Parenti, G.M. Hanozet, B. Giordana, P. Luthy y M.G. Wolfersberger. 1986. *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits *Pieris brassicae* midgut cells. FEBS **204**: 213-218.
- Sangdala S., F.S. Walters, L.H. English y M.J. Adang. 1994. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and $86\text{Rb}^+-\text{K}^+$ efflux in vitro. J. Biol. Chem. **269**: 10088-10092.
- Schnepf H. E. y H. R. Whiteley. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **78** : 2893-2897.
- Schnepf H.E., H.C. Wong y H.R. Whiteley. 1985a. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. J. Biol. Chem. **260**: 6264-6272.
- Schnepf H.E. y H.R. Whiteley. 1985b. Delineation of a toxin-encoding segment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. J. Biol. Chem. **260**: 6273-6280.
- Schnepf H.E., K. Tomczak, J.P. Ortega y H.R. Whiteley. 1990. Specificity-determining regions of a lepidopteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. J. Biol. Chem. **265**: 20923-20930.
- Schwartz J.L., L. Garneau, D. Savaria, L. Masson, R. Brosseau y E. Brosseau. 1993. Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation and anion-selective channels in planar lipid bilayers. J. Membrane Biol. **132**: 53-62.

- Sekar V., D.V. Thompson, M.J. Maroney, R.G. Bookland and M.J. Adang. 1987. Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **84**: 7036-7040.
- Shimizu T. y K. Morikawa. 1996. The β -prism: a new folding motif. Trends Biochem. Sci. **21**: 3-6.
- Slatin S.L., C.K. Abrams y L. English. 1990. Delta-endotoxin form cation-selective channels in plannar lipid bilayers. Biochem. Biophys. Res. Comm. **169**: 765-772.
- Smith G.P. y D.J. Ellar. 1994. Mutagenesis of two surface-exposed loops of the *Bacillus thuringiensis* CryIC δ -endotoxin affects insecticidal specificity. Biochem. J. **302**: 611-616.
- Studier F. W. Y B. A. Moffat. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. **189**: 113.
- Thompson M. 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* isolate having anti-protozoan activity. European Patent. Application number: 91305048.0 Publication number: 0 461 799 A3.
- Vadlamidi, R. K., E. Weber, I. Ji, T. H. Ji y L. A. Bulla Jr. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. J. Biol. Chem. **270**: 5490-5494.
- Van Rie J., S. Jansens, H. Hofte, D. Degheele y H. Van Mellaert. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. Eur. J. Biochem. **186**: 239-247.

- Van Rie J., S. Jansens, H. Hofte, D. Degheele y H. Van Mellaert. 1990a. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1378-1385.
- Van Rie J., W.H. McGaughey, D.E. Johnson, B.D. Barnett y H. Van Mellaert. 1990b. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science.* **247**: 72-74.
- Vázquez -Juárez, R. C. 1995. Producción de proteínas Cry truncadas en *Escherichia coli* y algunos factores que afectan su expresión. Tesis Profesional. Fac. de Ciencias Biológicas, UANL. Monterrey, México. 57 p.
- Von Tersch M.A., S.L. Slatin, C.A. Kulesza y L.H. English. 1994. Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIB2 and CryIIIB2 domain I peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3711-3717.
- Wabiko H., G.A. Held y L.A. Bulla Jr. 1985. Only part of the protoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner* 1715 is necessary for insecticidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 706-708.
- Widner W.R. y H.R. Whiteley. 1990. Location of the dipteran specific region in a lepidopteran-dipteran crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **172**: 2826-2832.
- Wolfersberger M. G. 1990. The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. *Experientia.* **46**: 475-477.

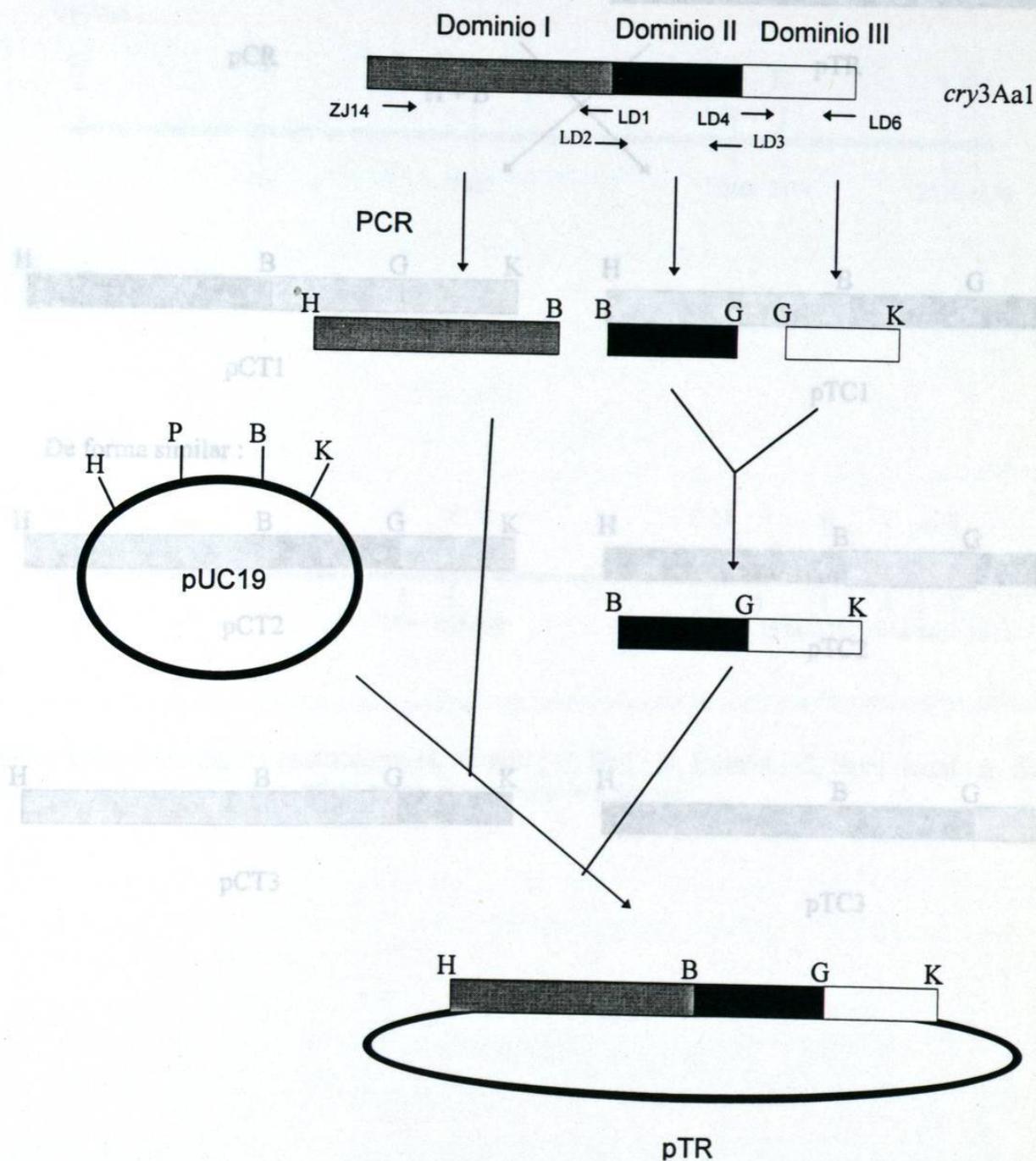
- Wu D. y A.I. Aronson. 1992a. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin involved in toxicity and specificity. *J. Biol. Chem.* **267**: 2311-2317.
- Wu D. y A.I. Aronson. 1992b. Localized mutagenesis defines regions important for toxicity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Gen. Biotech. Bac.* **3**: 211-220.
- Wu S. J. y D. H. Dean. 1996. Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIIIA δ -endotoxin. *J. Mol. Biol.* **255**: 628-640.
- Yanisch-Perron C., J. Vieira y J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103.
- Ymer S. 1991. Heat inactivation of DNA ligase prior to electroporation increases transformation efficiency. *Nucleic Acids Res.* **19**: 6960.
- Yunovitz H. y A. Yawetz. 1988. Interaction between the δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* ssp. *entomocidus* and liposomes. *FEBS Letts.* **230**: 105-108.

Intercambio de los dominios

APENDICE A

Diseño de las construcciones genéticas

Introducción de los sitios de restricción

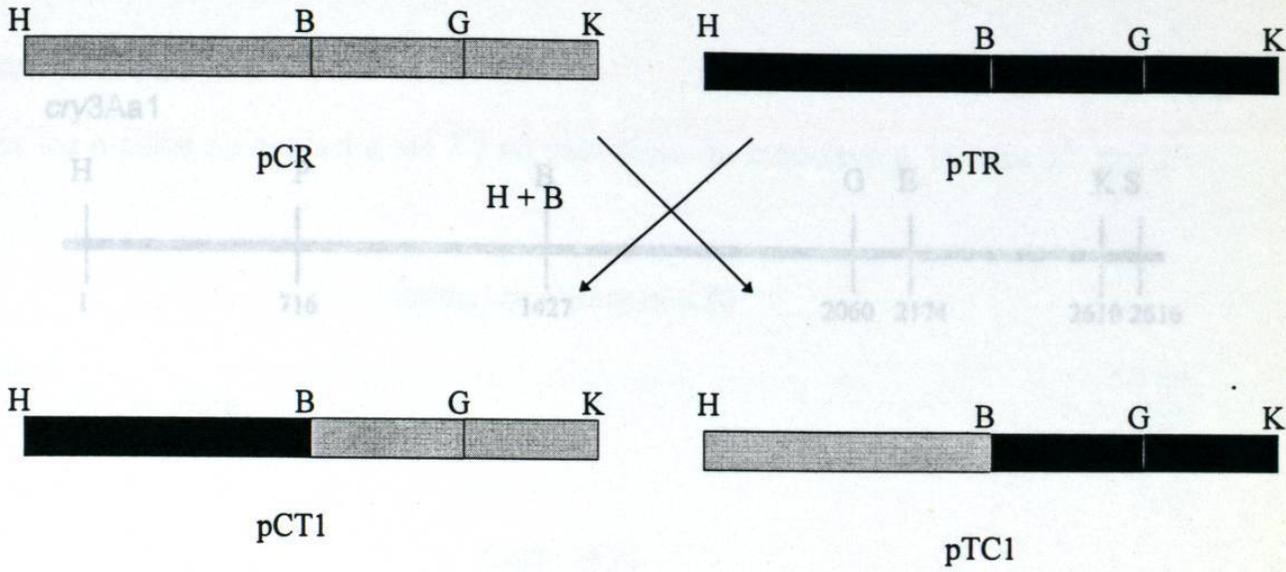


Sitios para enzimas de restricción: H, *HindIII* ; P, *PstI* ; B, *BamHI* ; G, *BglII* ; K, *KpnI*.
 Un procedimiento semejante se usó para construir pCR (ver texto).

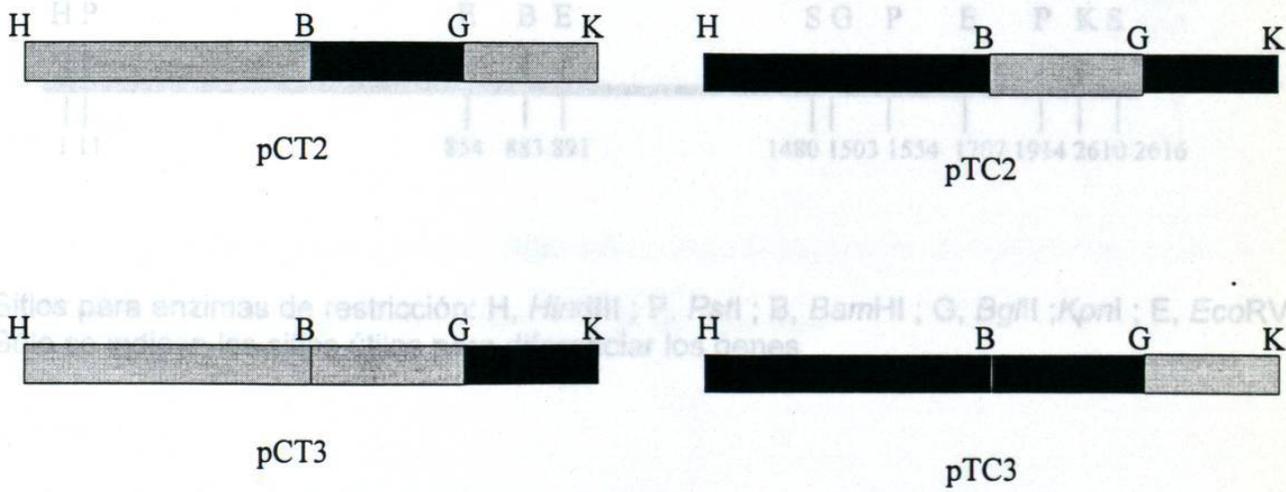
Intercambio de los dominios

APENDICE B

Mapas de restricción de cry3Aa1 y cry1Ac1



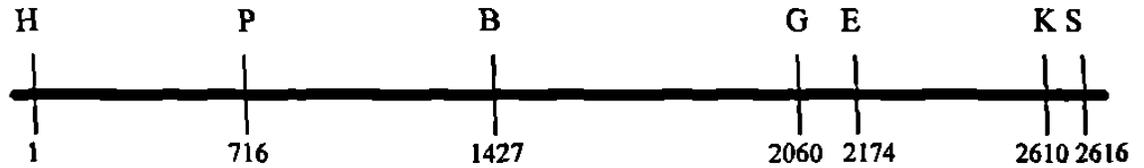
De forma similar :



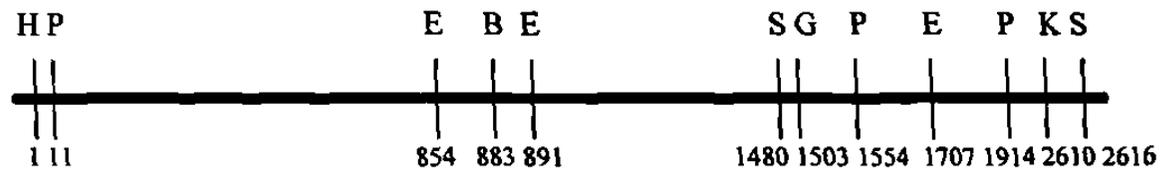
APENDICE B

Mapas de restricción de *cry3Aa1* y *cry1Ac1*

cry3Aa1



cry1Ac1



Sitios para enzimas de restricción: H, *HindIII* ; P, *PstI* ; B, *BamHI* ; G, *BglII* ; K, *KpnI* ; E, *EcoRV*
 Sólo se indican los sitios útiles para diferenciar los genes

APENDICE C

Preparación de Medios de Cultivo y Soluciones

Medios de Cultivo

Todos los medios se ajustan a pH 7 y se esterilizan en autoclave a 15 lb/pulg² por 20 min.

Caldo Luria-Bertani (LB)

| | |
|----------------------|--------|
| Triptona | 10 g/l |
| Extracto de Levadura | 5g/l |
| NaCl | 10g/l |

Caldo SOC

| | |
|-------------------------|--------|
| Triptona | 20g/l |
| Extracto de Levadura | 5g/l |
| NaCl | 0.5g/l |
| KCl (250mM) | 10 ml |
| MgCl ₂ (2 M) | 5 ml |
| Glucosa (1 M) | 20 ml |

Agar LB

Igual que el caldo LB, excepto que contiene 15 g/l de agar-agar

Soluciones

(Todos los buffer Tris se ajustan a pH 8.0, a menos que se especifique lo contrario y se filtran con membrana millipore de 0.45 m)

Buffer TAE 10X

| | |
|---------------------|----------|
| Tris base | 48.4 g/l |
| Ac. Acético Glacial | 57.1 ml |
| EDTA 0.5 M (pH 8.0) | 100 ml |

Buffer TBS 10X

| | |
|------------------|---------------|
| Tris base | 100 mM |
| NaCl | 1.5 M |

Buffer de Transferencia

| | |
|-------------------------|-----------------|
| Tris | 3.0 g/l |
| Glicina | 14.4 g/l |
| Metanol | 200 ml |
| Agua Bidestilada | 800 ml |

Buffer de Electroforesis de Proteínas 1X

| | |
|----------------|-----------------|
| Tris | 3.75 g/l |
| Glicina | 18 g/l |
| SDS | 1.25 g/l |

Buffer Tris 1.5 M (pH 8.8)

| | |
|-------------|------------------|
| Tris | 181.5 g/l |
|-------------|------------------|

Buffer Tris 1.0 M (pH 6.8)

| | |
|-------------|------------------|
| Tris | 121.1 g/l |
|-------------|------------------|

Buffer de Carga

| | |
|---------------------------|---------------|
| Azul de Bromofenol | 0.25 % |
| Xilencianol | 0.25 % |
| Glicerol en agua | 30 % |

Tween 20 al 2%ç

| | |
|-------------------|--------------|
| Tween 20 | 2 ml |
| Buffer TBS | 98 ml |

Tween 20 al 0.05%

| | |
|--------------------|---------|
| Tween 20 2% en TBS | 2.5 ml |
| Buffer TBS | 97.5 ml |

Solución Cromogénica

| | |
|-------------------|--------|
| Tris | 0.1 M |
| NaCl | 0.1 M |
| MgCl ₂ | 0.05 M |
| BCIP | 5 mg |
| NBT | 10 mg |

Solución de Tinción

| | |
|------------------|---------|
| Azul Brillante R | 0.012 g |
| Metanol | 20 ml |
| Ac. Acético | 3.6 ml |
| Agua Bidestilada | 26 ml |

Solución de Destinción

| | |
|------------------|--------|
| Metanol | 100 ml |
| Ac. Acético | 20 ml |
| Agua Bidestilada | 80 ml |

Mezcla Lítica

| | |
|--------------------------|---------|
| Buffer Tris 1 M (pH 6.8) | 0.31 ml |
| SDS | 2.0 ml |
| Glicerol | 1.0 ml |
| 2-Mercaptoetanol | 0.5 ml |
| Agua bidestilada | 1.34 ml |

SDS 10%

Disolver 10 g de SDS en 90 ml de agua bidestilada.

Persulfato de Amonio 10%

Disolver 10 g en 90 ml de agua bidestilada

Solución de Ponceau S

| | |
|-------------------------|--------|
| Ponceau S | 2 g |
| Ac. Tricloroacético | 30 g |
| Ac. Sulfosalicílico | 30 g |
| Agua bidestilada c.b.p. | 100 ml |

Agarosa 1% en buffer TAE

Disolver 1 g de agarosa en 99 ml de Buffer TAE

Acrilamida-Bisacrilamida 30%

| | |
|-------------------------|--------|
| Acrilamida | 29 g |
| Bisacrilamida | 1 g |
| Agua bidestilada c.b.p. | 100 ml |

Filtrar en membrana millipore de 0.45 μm

Solución de CaCl_2 0.1 M

| | |
|--|--------|
| $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | 54 g |
| Agua bidestilada c.b.p. | 200 ml |

Esterilizar por filtración con membrana millipore 0.22 μm

