

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



MECANISMO DE ACCION DE LA ONCOTOXINA

DE *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*

POR:

EDGAR MENDOZA GAMBOA

**COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGIA**

DICIEMBRE, 1998

TD
QR82
.B3
M4
c.1



1080087129

9445-164

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE LA ONCOTOXINA DE
ESTRUCTURA DE LA ONCOTOXINA
DE *Escherichia coli* O157:H7

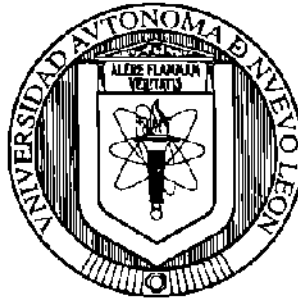
POR:
EDGAR MENDOZA GAMBOA

COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGIA

DICIEMBRE 1998

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**MECANISMO DE ACCION DE LA ONCOTOXINA DE
Bacillus thuringiensis var. *thuringiensis***

Por

EDGAR MENDOZA GAMBOA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en
Microbiología**

Diciembre, 1998



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**MECANISMO DE ACCION DE LA ONCOTOXINA DE
Bacillus thuringiensis var. *thuringiensis***

COMISION DE EXAMEN

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
PRESIDENTE

A handwritten signature in black ink, appearing to read "C. Rodríguez", written over a horizontal line.

Dra. Diana Resendez Pérez
SECRETARIO

A handwritten signature in black ink, appearing to read "D. Resendez", written over a horizontal line.

Dr. Reyes S. Tamez Guerra
VOCAL

A handwritten signature in black ink, appearing to read "R. Tamez", written over a horizontal line.

Diciembre, 1998

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**MECANISMO DE ACCION DE LA ONCOTOXINA DE
Bacillus thuringiensis var. *thuringiensis***

COMISION DE APROBACION DE TESIS

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Director de Tesis

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Cristina Rodríguez Padilla", written over a horizontal line.

Dr. Reyes S. Tamez Guerra
Co-Director de Tesis

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Reyes S. Tamez Guerra", written over a horizontal line.

Dra. Julia Verde Star
Subdirectora de Postgrado

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Julia Verde Star", written over a horizontal line.

Diciembre, 1998

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U. A. N. L. y en el Laboratorio de Investigación de Citocinas del Departamento de Oncología Molecular del Hospital M. D. Anderson Cancer Center de la Universidad de Texas, bajo la dirección de la Dra. Cristina Rodríguez Padilla y del Dr. Bharat B. Aggarwal como asesor externo.

DEDICATORIA

A mis padres:

**Profr. Agustín Mendoza Delgadillo
Sra. Ma. Elena Gamboa Cásarez
Con amor y agradecimiento**

A mis hermanos:

**Agustín, Laura Elena, Raúl, Julián Gerardo, Beatriz y Hugo César
Por su cariño y apoyo que siempre me han brindado**

A mis familiares y amigos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Cristina Rdríguez Padilla, mi más sincero agradecimiento, por su dirección y apoyo de base fundamental de mi formación profesional.

Al Dr. Reyes S. Tamez Guerra, por su confianza y apoyo incondicional he logrado llegar al término de una etapa más de mi formación profesional.

Al Dr. Bharat B. Aggarwal, por su valiosa asesoría y por haberme permitido hacer uso de sus instalaciones en el Laboratorio de Investigación de Citocinas del Departamento de Oncología Molecular del Hospital M. D. Anderson Cancer Center de la Universidad de Texas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por su apoyo brindado durante la realización de éste trabajo.

Al Dr. Bryant G. Darnay, por sus consejos y apoyo brindados siempre; gracias por su amistad.

A mis compañeros del Laboratorio de Inmunología y Virología, por su amistad y apoyo brindado durante el desarrollo de éste trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo		Página
1.	Introducción	
1.1	La oncotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i>	1
1.2	Breve historia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
1.3	Clasificación de <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
1.4	Actividad antitumoral del cristal proteico de <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
1.5	Mecanismo de acción de la δ -endotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
1.6	Activación del factor de transcripción NF- κ B.....	11
	1.6.1 NF- κ B como un activador de la transcripción.....	13
	1.6.2 El factor de transcripción NF- κ B regula la expresión de una gran variedad de genes.....	14
	1.6.3 NF- κ B como un blanco en terapias.....	14
1.7	Apoptosis.....	15
	1.7.1 Indicios de la apoptosis.....	16
	1.7.2 Agentes reguladores de la apoptosis.....	18
	1.7.3 Eliminación de los restos celulares.....	20
	1.7.4 Significado de la apoptosis durante el desarrollo y en enfermedades.....	20
1.8	Hipótesis.....	22
1.9	Objetivos.....	22
2.	Materiales y Métodos	
2.1	Marcaje radioactivo de la oncotoxina con ^{125}I	23
2.2	Ensayo de radioreceptores de la oncotoxina- ^{125}I en células U-937.....	26
2.3	Activación del factor de transcripción NF- κ B por la oncotoxina en las células U-937.....	27
	2.3.1 Preparación del extracto nuclear y citoplásmico.....	27

Capítulo	Página
2.3.2	Ensayo del cambio de movilidad electroforética.....31
2.4	Análisis de la fragmentación del DNA de células del linfoma histiocítico humano (U-937) en geles de agarosa.....32
2.5	Aislamiento del DNA cromosomal de <i>Bacillus thuringiensis</i>33
2.6	Southern blot hibridación del DNA de diferentes serotipos de <i>Bacillus thuringiensis</i>34
2.6.1	Transferencia del DNA a la membrana de Hybond-N+.....34
2.6.2	Fijación del DNA.....35
2.6.3	Hibridación del DNA.....35
3.	Resultados
3.1	Marcaje radioactivo de la oncotoxina con ¹²⁵ I.....37
3.2	Ensayo de radioreceptores de la oncotoxina- ¹²⁵ I en células del linfoma histiocítico humano (U-937).....38
3.3	Activación del factor de transcripción NFκB por la oncotoxina en células del linfoma histiocítico humano (U-937).....38
3.4	Análisis de la fragmentación del DNA de células del linfoma histiocítico humano (U-937).....38
3.5	Aislamiento del DNA cromosomal de <i>Bacillus thuringiensis</i>39
3.6	Southern blot hibridación del DNA de diferentes serotipos de <i>Bacillus thuringiensis</i>39
4.	Discusión.....40
5.	Conclusiones.....43
	Bibliografía.....73

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Electroforesis de la oncotoxina de <i>Btt</i> en geles SDS-PAGE al 15%.....	49
2.	Secuenciación de los aminoácidos de la porción amino terminal de la oncotoxina de <i>Btt</i>	50
3.	La actividad biológica de la oncotoxina es neutralizada por los anticuerpos específicos al péptido sintético de la oncotoxina.....	51
4.	Análisis del western blot durante la purificación de la oncotoxina utilizando los anticuerpos anti-Otp.....	52
5.	Diseño Experimental.....	54
6.	Autoradiograma de la oncotoxina marcada con ¹²⁵ I.....	56
7.	Unión competitiva de la oncotoxina- ¹²⁵ I y de la oncotoxina no radioactiva a células del linfoma histiocítico humano (U-937).....	58
8.	Mecanismo de activación del factor de transcripción NF-κB.....	59
9.	Activación del factor de transcripción NF-κB por la oncotoxina.....	62
10.	Cinética de activación del factor de transcripción NF-κB por la oncotoxina.....	63
11.	La oncotoxina induce apoptosis en células del linfoma histiocítico humano (U-937). Fotografía al microscopio óptico.....	66

Figura	Página
12.	Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de DNA de células U-937 tratadas con la oncotoxina.....67
13.	Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de DNA de células U-937 tratadas con la oncotoxina.....68
14	Mecanismo de acción de la oncotoxina de <i>Btt</i>69
15.	Oligonucleótido de la oncotoxina de <i>Btt</i>70
16.	Southern blot hibridación del DNA de diferentes serotipos de <i>Bacillus thuringiensis</i>71
17.	Análisis del western blot de las proteínas de diferentes serotipos de <i>Bt</i> utilizando anticuerpos policlonales Anti-Otp.....72

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Caracterización biológica y fisicoquímica de la oncotoxina.....	44
II	Nomenclatura de las toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	45
III	Proteínas de unión y probables receptores para las δ -endotoxinas.....	53
IV	Determinación de las cpm de las fracciones eluídas durante el marcaje radioactivo de la oncotoxina con ^{125}I	55
V	Ensayo de radioreceptores de la oncotoxina- ^{125}I en células del linfoma histiocítico humano (U-937).....	57
VI	Agentes inductores de la activación del NF- κ B.....	60
VII	NF- κ B regula la expresión de una gran variedad de genes.....	61
VIII	Características de la apoptosis.....	64
IX	Inductores de la apoptosis.....	65

ABREVIATURAS

<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Btt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i>
CO ₂	dióxido de carbono
°C	grados centígrados
cm	centímetro
cpm	cuentas por minuto
Cry	proteínas del cristal
Cyt	proteínas citolíticas
DNA	ácido desoxirribonucleico
δ-endotoxina	delta-endotoxina
EMSA	Ensayo del cambio de movilidad electroforética
g	gramos
¹²⁵ I	yodo-125
IL-1	Interleucina-1
kDa	kilodaltons
kg	kilogramos
mA	milliamperes
mCi	miliCuries
mg	miligramos
ml	mililitro
μg	microgramos
μl	microlitros
M	molar
N ₂	nitrógeno
nm	nanómetro

nM	nanoMolar
OT	oncotoxina
O ₂	oxígeno
³² P	fósforo-32
PBS	buffer de fosfatos salino
pmoles	picomoles
%	por ciento
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
	dodecil sulfato de sodio
subsp	subspecie
TNF- α	Factor Necrótico Tumoral alfa
VMMA	vesículas de membrana de la microvellosidad apical

RESUMEN

Las proteínas que selectivamente matan células tumorales *in vitro* tienen un gran potencial como agentes anticancerígenos. En el presente trabajo describimos el mecanismo de acción de la oncotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. La identificación de la oncotoxina se basó en su actividad citotóxica *in vitro* contra diferentes líneas de células tumorales, específicamente contra el linfoma histiocítico humano (U-937), sin afectar células normales. Mediante ensayos de unión por competencia, la oncotoxina marcada con yodo 125 se une específicamente a sitios de unión de las células U-937, su unión fue inhibida por una competencia homóloga con la oncotoxina no radioactiva. El mecanismo molecular, de la actividad citotóxica de la oncotoxina, es mediante la activación de uno de los factores de transcripción NF- κ B, que controla la expresión, de una gran variedad de genes involucrados en la respuesta inmune e inducción de la fragmentación del DNA de las células del linfoma histiocítico humano U-937, la cual es una de las características de la muerte celular por apoptosis. Mediante ensayos de hibridación del DNA encontramos que otros serotipos de *Bacillus thuringiensis* presentan secuencias similares a la oncotoxina.

ABSTRACT

Proteins that selectively kill tumor cells *in vitro* have potential as anticancer agents. In the present report, we describe the mechanism of action by oncotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. The identification of oncotoxin was based on its cytotoxic activity against a wide variety of different human tumor cell lines, specifically on human histiocytic lymphoma U-937 cells, but not normal cells. By radioreceptors assay, the oncotoxin labeled with iodine-125 bound specifically to U-937 cells. Its binding to the human tumor cells was competitively inhibited by non-iodinated oncotoxin. The mechanism of cytotoxic activity of oncotoxin is by activation of a nuclear transcription factor NF- κ B, that regulates the expression of a large number of genes that play essential roles in immune response and also the oncotoxin induces DNA fragmentation in human histiocytic lymphoma U-937 cells which is one of the hallmarks of apoptotic mechanism of cell death. By western blot analysis and southern blot hybridization of DNA, different subspecies of *Bacillus thuringiensis* have shown sequences of the oncotoxin.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 La oncotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*

Agentes que presentan actividad citotóxica selectiva hacia células tumorales tienen un gran potencial como drogas anticancerígenas. Dicha clase de agentes se han obtenido tanto de fuentes naturales como sintéticas, de naturaleza proteica o no proteica. Es conocido que tanto las bacterias gram-negativas como las gram-positivas sintetizan proteínas que son tóxicas a células eucarióticas (1).

La bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es un bacilo del suelo, gram-positivo, aeróbico, esporulado, con flagelos peritricos, que se caracteriza porque después de terminar su crecimiento vegetativo, contiene además de la spora una inclusión cristalina de naturaleza proteica, en forma de diamante o bipiramidal, designada como delta-endotoxina (2). Esta toxina presenta varias actividades biológicas, la primera y más ampliamente estudiada es su actividad tóxica específica contra larvas de insectos plaga de importancia agrícola y en Salud Pública sin afectar a mamíferos (3, 4). La delta-endotoxina de *Bt* presenta actividad nematocida, ya que preparaciones del cristal proteico son letales a huevecillos y larvas de nemátodos zooparásitos tanto *in vivo* como *in vitro* (5, 6, 7, 8). El cristal proteico de *Bt* incrementa la respuesta inmune al actuar como adyuvante en ratas y cobayos que han sido inmunizados a diversos antígenos (9, 10). Además se ha reportado su actividad antitumoral en modelos experimentales murinos que presentaban sarcoma ascítico de Yoshida, carcinoma pulmonar Lewis, leucemia L-1210, carcinoma de Ehrlich, melanoma B16 y fibrosarcoma meth A (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

Hemos determinado que una proteína de 20 kilodaltones (kDa), designada como oncotoxina (Figura 1), purificada a partir de la δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* variedad *thuringiensis* presenta actividad citotóxica *in vitro* hacia diferentes líneas de células tumorales humanas, incluyendo mieloide (U-937, THP-1, HL-60), linfoide (Raji, Jurkat), eritroblastoide (K-562), carcinoma de mama (CLO, MCF-7), de ovario (OVCA-429, OVCA-432, OVCA-433), de riñón (A-293), de hígado (Hep3B, HepG2), pero sin afectar células normales. La actividad biológica de la proteína purificada fue sensible a varias enzimas proteolíticas, incluyendo tripsina, quimiotripsina y pronasa. También fue sensible a condiciones ácidas (pH menor de 4), ácido trifluoroacético (0.1%) y acetonitrilo (50%). Fue resistente a altas temperaturas (100°C durante 30 minutos) y a condiciones reductoras, ditiotreitól 1mM (Tabla I). Se secuenciaron los primeros 20 aminoácidos de la porción amino terminal de la oncotoxina (Figura 2), encontrándose que es una secuencia única al hacerse comparación con las secuencias de otras proteínas. Se sintetizó el polipéptido correspondiente a estos primeros 20 aminoácidos, el cual se usó para preparar anticuerpos policlonales en conejos, con esos mismos anticuerpos se neutralizó la actividad biológica de la oncotoxina (Figura 3). Mediante análisis de western blot estos mismos anticuerpos reconocieron la banda de la oncotoxina de 20 kDa (Figura 4). Además se ha observado que la oncotoxina es capaz de inducir la producción de óxido nítrico y TNF- α en macrófagos activados (18). Las inclusiones cristalinas de *Bt* disueltas en el intestino medio de los insectos liberan una o más proteínas insecticidas de 27 a 140 kDa; la clasificación de los genes de las proteínas insecticidas del cristal se basa en su espectro insecticida además de la estructura primaria de las proteínas, asignados

en dos grupos: genes cry (proteínas insecticidas del cristal) y genes cytA (proteínas citolíticas del cristal) (19).

1.2 Breve historia de *Bacillus thuringiensis*

El descubrimiento de la bacteria *Bt* se realizó en 1901 por el investigador japonés Ishiwata, quien la aisló a partir de larvas enfermas del gusano de seda *Bombix mori* y la denominó *Bacillus sotto* (2, 20). En 1911, el alemán Berliner aisló una bacteria similar a ésta a partir de larvas enfermas de la palomilla de la flor del mediterráneo *Anagasta kuhniella* y en 1915 la denominó *Bacillus thuringiensis*; la describe como un bacilo esporulado, gram-positivo, con flagelos peritricos, observó que después de terminar su crecimiento vegetativo el bacilo contiene además de la spora una inclusión parasporal a la cual designó como "restkorper" o cuerpo de desecho, sugiriendo que estaba formado de material celular que no se requiere para la formación de la spora; también describió que este cuerpo de desecho inicialmente era esférico incrementándose en tamaño hasta llegar a tener una forma romboidal (21). En 1954 Angus demostró que la toxicidad en el insecto estaba asociada principalmente con la inclusión cristalina (22, 23). Posteriormente en 1955 Hannay y Fitz-James reportaron que la inclusión cristalina parasporal era de naturaleza proteica y su ingestión era suficiente para causar la muerte a larvas de insectos susceptibles (24). Así en 1967 Heimpel agrupó a las bacterias cristalíferas como variedades de *Bt* y denominó a la toxina del cristal como delta-endotoxina (2).

1.3 Clasificación de *Bacillus thuringiensis*

La clasificación de *Bt* ha tomado gran relevancia por su enorme potencial industrial y científico. De esta manera se han diseñado dos sistemas básicos de identificación: el serológico, en base al antígeno flagelar "H"; y el que se basa en el espectro de acción de las toxinas, denominado patotipo (25).

En 1959 y 1967 Heimpel y Angus en base a criterios morfológicos y bioquímicos, sugieren que el microorganismo aislado por Berliner sea el cultivo tipo para la especie, y que las otras bacterias formadoras de cristal fueran variedades de éste, además proponen el nombre de delta-endotoxina para la proteína del cristal (26).

En 1962 de Barjac y Bonefoi describieron un método de clasificación para diferentes especies de bacilos entomopatógenos productores del cristal mediante pruebas bioquímicas y serológicas con 24 cepas. Su identificación se basó en reacciones específicas contra el antígeno flagelar "H" presente en las células vegetativas móviles de estas especies (27, 28). En 1964 Norris estudió 46 cepas de bacterias productoras del cristal. Los resultados que se obtuvieron indicaron que las pruebas bioquímicas son muy amplias y no permiten establecer una clasificación, debido a que solo proporcionan información de las reacciones bioquímicas que realizan las bacterias, y no de la naturaleza de las enzimas involucradas en dichas reacciones, observó también que las reacciones antígeno-anticuerpo eran de suma importancia para la clasificación taxonómica, debido a que es una técnica de alta especificidad y afinidad que proporciona información sobre la estructura molecular de los antígenos flagelares (29).

Otra técnica propuesta para agrupar especies de *Bacillus thuringiensis* diferentes del antígeno flagelar "H" fue la descrita por

Sekijima y Ono en 1982, donde utiliza antígenos somáticos termoestables "O", mediante la técnica de aglutinación en tubo de células vegetativas, sin establecer diferencia entre las variedades *kurstaki*, *galleriae* y *aisawai*, así como *alesti* y *darmstadiensis* que pertenecen a diferentes serotipos H. Resultando ser un sistema confuso (30).

En 1989, Höfte y Whiteley propusieron un esquema de clasificación diferente a todos los que se habían descrito hasta ese momento, este sistema de clasificación de la proteína del cristal se basa en la secuencia de los aminoácidos y en su especificidad de insectos, identificando 14 genes de diferentes toxinas, 13 de los cuales se hayan relacionados entre sí (Cry) y uno no relacionado que colocaron en un lugar aparte (Cyt), estos genes se dividieron en cinco clases. Con el tiempo se fueron descubriendo más genes de las toxinas y este sistema comenzó a ser poco entendible, ya que genes con secuencias similares presentaban una diferencia significativa en la especificidad insecticida (31).

Neil Crickmore, en 1996, propuso un nuevo sistema de clasificación únicamente en base a la identidad de los aminoácidos. Recientemente se ha revisado esta nomenclatura y se ha organizado una gran cantidad de datos proporcionados por la secuencia genómica, para ello se ha propuesto un modelo de acuerdo a bases conceptuales y un formato de nomenclaturas. Este tipo de sistemas se basa en la asignación de nombres a los miembros de los genes de las superfamilias de acuerdo a su grado de divergencia evolucionaria, estimado por el árbol de algoritmos filogenéticos. El formato de Nomenclatura, es un sistema diseñado para convertir la información contenida acerca de estas interrelaciones, se basa en anexar a la raíz mnemónica una serie de números y letras asignados en orden jerárquico para indicar los grados de divergencia filogenética, de acuerdo a esta nueva nomenclatura muchos

de los nombres originales se han mantenido, aunque un número de ellos ha sido reclasificado (Tabla II), (32).

1.4 Actividad antitumoral del cristal proteico de *Bacillus thuringiensis*

En 1974 Prasad y Shethna demostraron que la proteína purificada a partir del cristal proteico de *Bacillus thuringiensis* variedad *thuringiensis* inhibió el crecimiento del sarcoma ascítico de Yoshida tanto *in vivo* como *in vitro* (12). La administración de una dosis de proteína a una concentración de 0.1 mg/kg durante cinco días por vía intraperitoneal a ratas Wistar que presentaban el sarcoma, resultó en una completa regresión del tumor. En condiciones *in vitro* se observó que una dosis de 1 mg/ml reducía la viabilidad de las células tumorales en un 60% (13). Además observaron que esta proteína inhibió la captación e incorporación de precursores marcados radioactivamente en las macromoléculas; por lo que limita el pool de precursores necesarios para la síntesis de DNA, RNA y proteínas al dañar la integridad de la membrana celular. Esto fue confirmado por la salida de constituyentes celulares marcados con ³²P, proteínas y material que absorbe a 260 nm. Estas observaciones sugieren que la actividad citotóxica de esta proteína se efectúa al dañar la permeabilidad de la membrana de las células tumorales (14).

En 1985 Zamola y colaboradores observaron que al exponer cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* a radiación ultravioleta a 254 nm (60 mW) durante 35 a 45 minutos incrementaba considerablemente la actividad antitumoral de la proteína en modelos experimentales murinos de la línea C57BL-6 que presentaban carcinoma pulmonar Lewis (15).

En 1988 Yokoyama y colaboradores purificaron una proteína de 25 kDa a partir de la inclusión parasporal producida por *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis*. Esta proteína inhibió en un 50% el crecimiento del cultivo de células de leucemia murina L-1210 con 0.9 mg/ml. Interactuando con constituyentes lipídicos de la membrana celular, principalmente con fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y esfingomiélin. Cuando esta proteína se utilizó en combinación con fármacos anticancerígenos, hubo un efecto sinérgico, siendo la de mayor efecto potenciador la bleomicina. El mecanismo de potenciación aún no está claro, pero la interacción entre la proteína de 25 kDa y los lípidos de la membrana celular puede jugar un papel muy importante (16).

En 1991 Yokoyama y colaboradores evaluaron el sinergismo que existe entre la proteína de 25 kDa purificada a partir del cristal de *Bt* subespecie *israelensis* y la bleomicina en modelos experimentales de ratones que presentaban tumores sólidos; carcinoma de Ehrlich, melanoma B16 y fibrosarcoma meth A. Observando que aquella dosis de la proteína 0.3 mg/kg/día inefectiva cuando se utilizaba por sí sola, presentaba una apreciable inhibición del crecimiento del tumor al utilizarse en combinación con bleomicina. La citotoxicidad de esta proteína pudiera deberse a su interacción con fosfolípidos de la membrana celular formando poros que darían origen a una lisis osmótica coloidal (17).

En 1994 Yokoyama y Kohda determinaron que una proteína de 25 kDa purificada a partir de la delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* incrementa la citotoxicidad *in vitro* de la bleomicina contra las células de la leucemia murina L-1210, aparentemente por un rompimiento en la cadena del DNA (18).

Hemos determinado que una proteína de 20 kDa, designada como oncotoxina, purificada a partir de la δ -endotoxina de *Bt* variedad *thuringiensis* presenta actividad citotóxica hacia diferentes líneas de células tumorales humanas, incluyendo mieloide (U-937, THP-1, HL-60), linfoide (Raji, Jurkat), eritroblastoide (K-562), carcinoma de mama (CLO, MCF-7), de ovario (OVCA-429, OVCA-432, OVCA-433), de riñón (A-293), de hígado (Hep3B, HepG2) (datos sin publicar).

1.5 Mecanismo de acción de la δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis*

Los síntomas que se observan a partir del primer minuto posterior a que las larvas de insectos susceptibles ingieren los cristales y esporas de *Bt* son; cese de la ingesta, parálisis del intestino, parálisis total y finalmente muerte del insecto (33).

El mecanismo de acción de las proteínas de la delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* involucra solubilización del cristal en el intestino medio de los insectos, proteólisis de la protoxina por las proteasas del intestino medio, unión de las proteínas Cry a receptores del intestino, e inserción de las proteínas a la membrana para crear canales iónicos o poros. Los cristales están compuestos de protoxinas. Para que las protoxinas se activen deben ser ingeridas por insectos susceptibles. La mayoría de los insectos, solubilizan las protoxinas bajo condiciones alcalinas del intestino medio, diferencias en el grado de solubilización explican las diferencias en el grado de toxicidad entre las proteínas Cry. Después del proceso de solubilización, la mayoría de las protoxinas son activadas a toxinas, al ser procesadas por las proteasas del intestino medio de los insectos, tales como enzimas del tipo de la tripsina o la quimiotripsina. Las toxinas Cry activadas se unen a receptores

específicos en las microvellosidades de las células del intestino medio de los insectos susceptibles: lepidópteros, coleópteros y dípteros (34). La unión puede ser de tipo reversible o irreversible. Posteriormente se puede efectuar una fuerte unión entre la toxina y el receptor, o una inserción de la toxina dentro de la membrana, o ambos procesos (35).

Se ha demostrado que la unión de las proteínas Cry a sitios específicos localizados en la microvellosidad de las células del intestino medio de las larvas de insectos es la etapa determinante de la alta especificidad de las δ -endotoxinas. La metodología más utilizada ha consistido en llevar a cabo estudios cinéticos de unión y competencia utilizando proteínas marcadas radioactivamente con yodo y vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA). Con la finalidad de estimar los parámetros de unión, la constante de disociación (K_d) y la concentración de sitios de unión (B_{max}), se han hecho experimentos donde la toxina marcada se pone a competir con la toxina no radioactiva (competencia homóloga), mientras que para conocer si dos toxinas Cry comparten un mismo sitio de unión se han llevado a cabo experimentos de competencia heteróloga. En la mayor parte de los análisis se ha encontrado que existe una correlación positiva entre los parámetros de unión y toxicidad. Los resultados de los primeros experimentos en los que se usaron insectos resistentes para estudiar este proceso apoyaron la idea de que la unión está correlacionada con la susceptibilidad, dado que los insectos resistentes mostraron pérdida de los sitios de unión (36). Los estudios de competencia heteróloga han revelado que la unión no es un proceso simple ya que las toxinas pueden unirse a más de un sitio en el intestino de su blanco, y también se presenta el caso en el que varias toxinas pueden competir por un mismo sitio de unión. Un ejemplo que ilustra esta complejidad es el de *Heliothis virescens*, especie en la que la

toxina Cry1Ac se une a varios sitios y éstos son diferentes de aquél por el que compiten dos toxinas muy relacionadas, Cry1Aa y Cry1Ab (37).

Los experimentos en los que se analiza la cantidad de toxina unida de manera irreversible a la membrana y que no puede ser desplazada en ensayos de competencia homóloga o heteróloga han mostrado ser más útiles en el entendimiento de este fenómeno. Ahora se sabe que la interacción inicial entre la toxina y su sitio de unión (unión reversible) es un requisito para la toxicidad pero no es suficiente. Los eventos posteriores tales como la unión irreversible y la inserción en la membrana parecen estar más correlacionados con la toxicidad (38).

Se han hecho importantes esfuerzos dirigidos a la identificación, purificación y caracterización de las moléculas que sirven de receptores a las δ -endotoxinas en la microvellosidad apical de las células del intestino medio de los insectos. La metodología más empleada ha sido separar las proteínas de las VMMA en electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y posteriormente transferirlas a membranas de nitrocelulosa, la unión específica de la toxina a alguna de las bandas se revela con un anticuerpo antitoxina y luego con un segundo anticuerpo dirigido contra el primero o bien con la marca de la toxina (biotina-estreptavidina o yodo 125). Es discutible que la proteína de unión conserve su estructura nativa en estas condiciones y que pueda interactuar de manera específica con la toxina, pero al parecer así ocurre. Esta evidencia sugiere que el sitio que reconoce la toxina en la proteína de unión es un epítipo muy pequeño o bien un carbohidrato, dado que una gran parte de las proteínas de la microvellosidad apical están glicosiladas. Haciendo este tipo de experimentos se ha encontrado que para la mayoría de las toxinas Cry1 estudiadas las moléculas a las que se unen con alta afinidad son glicoproteínas. Se propone que la

interacción inicial es la existente entre la toxina y el carbohidrato del receptor, mientras que la unión irreversible se asocia con una interacción más estrecha entre la toxina y la parte proteica de éste (39). En la Tabla III se enlistan los mayores avances en el establecimiento de la naturaleza bioquímica de las proteínas de unión, los posibles receptores para las proteínas Cry1, muestran que son miembros de la familia de las aminopeptidasas de tipo N con peso molecular cercano a 120 kDa. Se ha demostrado que al menos una porción de la aminopeptidasa esta unida a la membrana mediante un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI). El análisis de la secuencia de dos de las proteínas de unión para Cry1a en *Manduca sexta* que se han clonado indica que el GPI está unido a la proteína en su extremo carboxilo terminal. El ancla de GPI es susceptible a la acción de una fosfolipasa C específica endógena del insecto que la convierte en una forma soluble de 115 kDa. Esta forma soluble retiene su capacidad de unir a la toxina y lo hace de manera específica (48).

1.6 Activación del factor de transcripción NF- κ B

Todos los seres vivos requieren de una dinámica respuesta a cambios de su medio ambiente para sobrevivir. En los organismos superiores dicho fenómeno incluye una respuesta defensiva al estrés, daño y microorganismos patógenos. Para ello requieren de un sistema que actúe rápida y específicamente; por ejemplo, el sistema inmune es capaz de reconocer como extraños a los agentes patógenos por sus propiedades antigénicas. Para eliminarlos, varias células del sistema inmune son activadas y/o diferenciadas. Los anticuerpos son sintetizados y la respuesta inmune celular es activada. Para esto, el reconocimiento del agente invasor por las células T, células B, macrófagos y células

endoteliales desarrolla programas genéticos bien definidos para inducir la síntesis de mediadores solubles (citocinas, factores de crecimiento, etc.) y sus receptores. La expresión de genes es mediada a través de factores que controlan su transcripción. Entre esos factores que contribuyen a la inducción de esa respuesta genética, está el factor de transcripción NF- κ B. El factor de transcripción NF- κ B regula la expresión de un gran número de genes que juegan un papel importante en la respuesta inmune e inflamatoria. Los miembros de la familia del factor de transcripción Rel/NF- κ B se caracterizan porque son un complejo de multiproteínas que induce la síntesis de proteínas de defensa y señalamiento en células que han sido expuestas a una gran variedad de estímulos. Tres subunidades proteicas controlan las funciones biológicas del NF- κ B; I κ B, p50 y p65. I κ B es una subunidad de 35-43 kDa que *inhibe la unión del NF- κ B* y sirve para retenerlo en una forma inducible en el citoplasma de células que no han sido estimuladas. En respuesta a una amplia variedad de estímulos I κ B se va a disociar del complejo inactivo p50-p65 y una vez que ha *quedado libre este complejo p50-p65 se va a translocar hacia el núcleo e inducir la transcripción de genes* (Figura 8). La proteína p50, una de las dos subunidades de unión al DNA del NF- κ B, se caracteriza porque reconoce secuencias altamente conservadas en las regiones decámicas de las secuencias consenso GGGRNNYYCC; en donde R=bases púricas, Y= bases pirimidicas, N=cualquier nucleótido. La proteína p50 presenta homología a las proteínas rel y dorsal, involucradas en el señalamiento citoplásmico y nuclear, es idéntica a factores conocidos como KBF1, H2TF1 y EBP-1, y es sintetizada como un precursor inactivo de 110 kDa. La otra subunidad de unión al DNA del NF- κ B es la proteína p65, se une a secuencias menos conservadas de la región κ B y aparentemente también es homóloga a las proteínas rel/dorsal. La combinación de las

subunidades de unión al DNA, p50 y p65, del NF- κ B extienden el repertorio de las regiones de unión reconocidas con una alta afinidad.

Una de las características fisiológicas del NF- κ B es la de inducir la expresión de genes de defensa bajo condiciones amenazantes, como en infecciones virales y bacterianas o en estrés físico. (49).

1.6.1 NF- κ B como un activador de la transcripción

El papel del NF- κ B en la regulación celular es actuar como un mediador de la transcripción de una amplia variedad de genes. Es de importancia remarcar su habilidad para transportar señales desde el citoplasma hacia el núcleo y transactivar genes específicos al unirse directamente a sus promotores.

La versatilidad del sistema NF- κ B es evidente debido al gran número de agentes capaces de regular los niveles de unión del NF- κ B en el núcleo. A diferencia de los factores de transcripción que responden a un limitado número de agentes inductores como el shock térmico o receptores específicos de esteroides, diferentes señales desde diversas direcciones convergen sobre el NF- κ B para ser transmitidas hacia el núcleo. Señales que pasan a través del NF- κ B son lanzadas desde diferentes partes de la célula. En la Tabla VI se muestra una lista de agentes que son capaces de inducir la activación del factor de transcripción NF- κ B (50).

1.6.2 El factor de transcripción NF- κ B regula la expresión de una gran variedad de genes

En la Tabla VII se muestra una lista de los genes cuya expresión es controlada por el factor de transcripción NF- κ B. El NF- κ B induce muchos efectores de la respuesta inmune, inflamatoria o de la respuesta de fase aguda. Particularmente numerosos genes que codifican para citocinas, factores de crecimiento, quimiocinas, mensajeros biológicos que controlan y coordinan las funciones de muchas células, son sensibles al NF- κ B. Algunos de esos mensajeros pueden utilizar al NF- κ B para amplificar su señal mediante un mecanismo de autoregulación positiva; las citocinas TNF- α , TNF- β , IL-1 no solamente activan al NF- κ B, sino que ellas mismas son inducidas por el NF- κ B. En el caso del gen del TNF- α , la importancia observada del NF- κ B para su expresión puede depender del tipo de célula y del segmento de la región analizada del promotor (51).

1.6.3 NF- κ B como un blanco en terapias

EL NF- κ B presenta un amplio rango de efectos que son controlados por medio de un complejo sistema regulatorio de inhibidores y co-activadores. Dada la íntima conexión entre las reacciones de defensa y NF- κ B, éste factor de transcripción y sus reguladores podrían proporcionar un blanco central para la intervención terapéutica en varias enfermedades o condiciones patológicas como shock séptico/tóxico, reacciones de huésped contra injerto, condiciones inflamatorias agudas, respuesta de fase aguda, daños por radiación, arterosclerosis y cáncer. NF- κ B podría ser un blanco terapéutico contra infecciones por virus como HIV-1. Blancos específicos para pequeños inhibidores sintéticos podrían

ser el mismo factor de transcripción o cualquiera de las proteínas esenciales de señalamiento incluyendo proteínas quinasas específicas y las proteasas que digieren I κ B- α . A diferencia de los tratamientos de corto plazo, un tratamiento a largo plazo bloquearía la actividad del NF- κ B, suprimiendo severamente muchas funciones importantes del huésped (52).

1.7 Apoptosis

La muerte celular programada o apoptosis es un proceso mediante el cual estímulos ambientales o fisiológicos activan un programa genético que desencadena una serie de eventos específicos que culminan con la muerte y eficiente eliminación de la célula. La apoptosis es esencial para el desarrollo normal, juega un papel muy importante en procesos como la regulación inmune, embriogenesis y homeostasis de tejidos; cualquier alteración del proceso conduce a un amplio rango de defectos, desde letalidad embrionaria, a una alteración específica de tejidos del desarrollo postnatal, hasta una elevada susceptibilidad al cáncer. Terapias que modulan la regulación de la apoptosis proporcionan una nueva oportunidad para el tratamiento de numerosas enfermedades incluyendo cáncer, enfermedades virales, degeneración neuronal, linfoproliferación, inflamación, inmunodeficiencias, entre otras (Tabla VIII). En situaciones como cáncer y linfoproliferación, por ejemplo, la restauración de la respuesta apoptótica mediante tratamientos terapéuticos podría resultar ventajosa. En cambio, cuando la degeneración celular resulta de un proceso patológico, la restauración de la inhibición de la apoptosis también resultaría benéfica. Por lo que es necesario comprender e identificar tanto a los reguladores positivos y negativos de la apoptosis.

Se han identificado una gran variedad de genes que codifican productos que regulan la apoptosis y sirven de blanco para el desarrollo de nuevas drogas en la intervención de procesos patológicos. La mayoría de los genes que controlan la apoptosis se han conservado a través de la evolución desde mamíferos a nemátodos, moscas y virus. Los eventos bioquímicos básicos involucrados en el control de la apoptosis son muy similares y la información obtenida de un sistema para el estudio de la apoptosis puede ser directamente aplicable a otro (53).

1.7.1 Indicios de la apoptosis

La muerte celular puede ocurrir tanto por necrosis o apoptosis. La necrosis es usualmente considerada como resultado de un daño físico y no es controlada genéticamente, mientras que la apoptosis es una respuesta celular genéticamente controlada por estímulos fisiológicos específicos y del medio ambiente. Los síntomas entre la necrosis y apoptosis generalmente son diferentes. La necrosis se caracteriza por la destrucción de organelos citoplásmicos y pérdida de la integridad de la membrana plasmática, mientras que la apoptosis se asocia a una condensación del núcleo y el citoplasma y una fragmentación del DNA nuclear (54). Los cambios estructurales durante la apoptosis se llevan a cabo en dos etapas; la primera comprende una condensación del núcleo y del citoplasma y el rompimiento de la célula en un número de fragmentos estructuralmente bien preservados. En la segunda etapa esos cuerpos apoptóticos son fagocitados por otras células y son rápidamente degradados por enzimas lisosomales. El rompimiento de la doble cadena del DNA entre los nucleosomas para producir múltiples fragmentos de aproximadamente 185 pares de bases ocurre de una manera sincrónica

con la compactación de la cromatina. Esos fragmentos pueden ser observados mediante electroforesis en geles de agarosa a manera de una típica escalera. Este método ha sido ampliamente utilizado para identificar apoptosis. Se presume que la responsable del rompimiento del DNA nucleosomal es una endonucleasa dependiente de calcio. Una diferencia *in vivo* entre apoptosis y necrosis es que la completa eliminación de las células apoptóticas previene una respuesta inflamatoria, mientras que esto no sucede con la necrosis. El proceso de apoptosis para matar células se lleva a cabo con el mínimo daño a células y tejidos que se encuentran a su alrededor, lo cual probablemente acentúa su importancia durante el desarrollo normal. Aunque las rutas de apoptosis y necrosis pueden ser distintas, pudieran interconectarse *in vivo*. Algún evento que produce necrosis pudiera activar el proceso de apoptosis en los tejidos de alrededor, como resultado de la acumulación de restos celulares e inflamación. Como también, en algunas circunstancias pudiera ser posible que la inducción de apoptosis activara indirectamente el proceso de necrosis.

Existen diversos métodos para la determinación de la apoptosis; pérdida de la viabilidad celular (falla para la exclusión de colorantes vitales o ingestión de MTT), fragmentación del DNA (mediante electroforesis en geles de agarosa, electroforesis PFG, marcaje *in situ* de la transferasa terminal, tunnel), morfología celular y nuclear (estudio microscópico para visualizar la condensación de la cromatina, organización del DNA e integridad del citoplasma), activación de la proteasa de la cisteína (PARP o ruptura de láminas *in vivo* o *in vitro* e inhibición de la proteasa de la cisteína), sub pico G1 mediante análisis de FACS, e inhibición de Bcl 2, son algunos de los métodos más utilizados para la determinación de la apoptosis (55).

1.7.2 Agentes reguladores de la apoptosis

La apoptosis es regulada por factores fisiológicos y ambientales. Los factores de sobrevivencia (Rb, IGF-1, NGF, IG-3) *in vivo* e *in vitro* promueven la viabilidad celular y son un aspecto esencial para el desarrollo normal. Su ausencia podría ser una señal potente para activar la apoptosis. Además de la eliminación de los factores de sobrevivencia, la presencia de factores específicos de muerte (fas, c-myc, TNF, p53, Hid) también inducen la apoptosis. Se requiere de una adecuada regulación de los factores de sobrevivencia y de muerte para prevenir una excesiva o inapropiada sobrevivencia o muerte celular durante numerosos procesos del desarrollo fisiológico (56).

La apoptosis es también regulada por factores ambientales. Para aquellas células que han sufrido de un irreparable daño al DNA, la apoptosis es la principal forma de eliminación de esas células, cuya presencia podría resultar dañina al organismo. La proteína supresora de tumores, p53, funciona en parte al responder al DNA dañado e inducir apoptosis, lo cual es un aspecto crucial para la función de p53 como un supresor de tumores. Otros estímulos dañinos que se asocian con apoptosis; infección viral, inapropiada desregulación del control del crecimiento celular, daño celular y pérdida del contacto célula-célula o célula-substrato (Tabla IX). Se presume que la apoptosis existe como un guardian para prevenir la persistencia de células dañadas que podrían ser perjudiciales a un organismo multicelular (57).

La regulación de la apoptosis involucra un gran número de genes que pueden ser clasificados dentro de tres categorías: 1) Los genes supresores de la apoptosis que incluyen a los miembros de la familia de genes bcl-2 (bcl-2, bcl-xL, bcl-w, mcl-1, A1, ced-9, adenovirus E1B 19K, virus Epstein-Barr BHRF-1 y LMW5; 2) los genes que actúan como

efectores de la apoptosis e incluyen a la familia de genes ICE (Interleukin-1 β Converting Enzyme), además de algunos miembros de la familia bcl-2; bax, bak, nbk/bik1, bad, y bcl-xS; y 3) los genes intermediarios de la apoptosis como Fas/ Fas ligando, p53, myc, y WAF1 (58).

Los genes de la familia bcl-2 son esenciales para la regulación de la apoptosis y contribuyen a la patogénesis de muchas enfermedades. La expresión constitutiva de bcl-2 en algunos linfomas y leucemias causa un escape de esas células de la apoptosis en los centros germinales y contribuyen como principal elemento de la patogénesis. La inhibición de bcl-2 con oligonucleótidos antisentido induce la apoptosis en la leucemia mieloblástica e incrementa su sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos. Los genes de fas y fas ligando llevan a cabo funciones durante la apoptosis necesarias para el desarrollo, función y regulación del sistema inmune. Estudios efectuados tanto *in vivo* como *in vitro* sugieren que los genes fas/fas ligando están involucrados en la delección clonal de células T autoreactivas en órganos linfoides periféricos y en la eliminación de células T activadas después de haber respondido a antígenos extraños. Factores de la transcripción como myc, fos, jun, y p53 están estrechamente asociados con la proliferación celular y son de importancia en la apoptosis. La activación de c-myc induce apoptosis y requiere de la presencia de p53. La expresión constitutiva de c-myc incrementa la susceptibilidad de las células a la apoptosis inducida por shock térmico, cicloheximida y por una amplia variedad de agentes antitumorales (59).

Uno de los más importantes efectores de la apoptosis son los miembros de la familia de genes ICE. La homología que existe entre el producto del gen ced-3 de *Caenorhabditis elegans*, requerido para la muerte celular en gusanos, y las proteasas de la cisteína de la familia ICE

de humanos; sugieren la importancia de las proteasas de la cisteína en la apoptosis. Se han identificado una gran variedad de proteasas de la cisteína en mamíferos, cuya actividad se incrementa durante la apoptosis: nedd-2/ich-1, TX/ich-2/ICErel-II, ICErel-III, Mch-2 y CPP32. Inhibidores de los miembros de la familia de ICE inhiben la apoptosis, indicando el requerimiento de una degradación proteolítica específica en la muerte celular de mamíferos. Existen diferentes sustratos para las proteasas de ICE, que al efectuarse su ruptura proteolítica se producen eventos nucleares y citoplásmicos asociados con la apoptosis (60).

1.7.3 Eliminación de los restos celulares

Uno de los principales factores que distinguen la apoptosis de la necrosis es la eficiente degradación y eliminación de los residuos celulares lo que previene una respuesta inflamatoria y posiblemente una inapropiada disposición de antígenos del hospedero. Este es uno de los aspectos menos entendido de la apoptosis en mamíferos, aunque se han identificado un grupo de genes requeridos para la degradación y eliminación de los residuos celulares en *C. elegans*. Estos genes codifican proteínas que regulan la fagocitosis, y que controlan la actividad de una nucleasa. Se cree que análogos de esas actividades también existen en mamíferos (61).

1.7.4 Significado de la apoptosis durante el desarrollo y en enfermedades

La presencia de la apoptosis se ha asociado con numerosos aspectos durante el desarrollo de mamíferos y en enfermedades

específicas. También se ha demostrado que cualquier alteración para que se efectúe el proceso de apoptosis afecta el desarrollo del organismo y contribuye a la presencia de enfermedades. En moscas y gusanos la activación e inhibición de apoptosis es requerida para el desarrollo normal. Esto es muy similar a lo que sucede en mamíferos aunque más complejo debido al gran número de genes involucrados en la regulación de la muerte celular. La función de Bcl-2 es requerida para mantener la viabilidad de los linfocitos, melanocitos, epitelio intestinal, y células de riñón durante el desarrollo del organismo. Bcl-x se requiere para inhibir la muerte celular durante la embriogénesis, principalmente en el sistema nervioso. En cambio, Bax se requiere para la apoptosis en timocitos y para mantener la viabilidad de los espermatozoides. La pérdida de la capacidad para regular la apoptosis se relaciona directamente con enfermedades. Procesos de linfoproliferación y enfermedades semejantes al lupus en ratones se atribuyen a una pérdida de la función en Fas o Fas ligando. La expresión de Fas ligando previene rechazo de injertos en transplantes. La pérdida de la función de p53 o la activación de Bcl-2 se relacionan directamente con la presencia de cáncer. La apoptosis es parte de la patología de una infección viral en el caso de adenovirus, baculovirus, HIV e influenza. La inhibición de la apoptosis se ha asociado a una infección persistente, latencia, o una incrementada producción viral en el caso de adenovirus, baculovirus, virus sindbis, herpesvirus, EBV y HIV, mientras que la apoptosis facilita la liberación viral. Por lo que se ha establecido una directa conexión de la apoptosis a numerosos procesos patológicos, permitiendo la identificación de genes que regulan la apoptosis y enfermedades, así como sus actividades bioquímicas, ofreciendo la posibilidad de establecer nuevas terapias (62).

1.8 Hipótesis

La oncotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* interactúa con receptores específicos en la membrana de células del linfoma histiocítico humano (U-937) activando señales de transcripción para efectuar su actividad citotóxica.

1.9 Objetivos

1. Determinar el mecanismo de acción de la oncotoxina en células de linfoma histiocítico (U-937):
 - a) Radioreceptores
 - b) Activación del factor de transcripción NF- κ B
 - c) Fragmentación del DNA

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS

2.1 Marcaje radioactivo de la oncotoxina con ^{125}I

La oncotoxina (5 μg) fue marcada radioactivamente con Na^{125}I (1mCi, Iodine-125, Amersham) mediante el método de yodogen (63):

1. Equilibrar la columna PD-10 Sephadex G-25 M (cat. no., 51-5107-00-AB, Pharmacia Biotech).
 - a) Fijar la columna PD-10 a un soporte metálico, al igual que un tubo cónico de 50 ml con un tubo capilar que pase a través de su tapa, procurando que su posición sea en un nivel más alto que el de la columna.
 - b) Preparar gelatina al 0.1% en buffer de fosfatos salino (Gelatin, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, cat. no. 14190-144, Gibco BRL).
 - c) Llenar el tubo de 50 ml con la solución de gelatina al 0.1% en PBS y permitir que pase a través del tubo capilar.
 - d) Drenar la solución de la columna PD-10.
 - e) Lavar la columna PD-10 con 50 ml de la solución de gelatina/PBS, regulando el flujo de la misma al ajustar la altura del tubo de 50 ml.
 - f) Permitir que los 50 ml de la solución de gelatina/PBS drenen a través de la columna y estará lista para ser utilizada en el procedimiento de yodinación.
2. Cubrir el tubo con yodogen.
 - a) Pesar 2 mg de yodogen y disolverlos en 2 ml de cloroformo.

- b) Agregar 50 μ l de la solución de yodogen en un tubo de plástico de 12 x 75 mm cubierto con aluminio y secarlo con gas N_2 , mediante rotación constante del tubo.
- c) Secar los tubos por lo menos 30 minutos si se van a utilizar inmediatamente, o si no mantenerlos en un desecador al vacío.

3. Yodinación.

a) Mantener en baño de hielo:

- a1) Oncotoxina (5 μ g).
- a2) Tubos cubiertos con yodogen.
- a3) 50 ml de la solución de gelatina al 0.1%/PBS.
- a4) buffer de fosfatos salino (PBS).

b) Al tubo que esta cubierto con yodogen agregarle 30 μ l de PBS, 5 μ g de la oncotoxina y 1 mCi de $Na^{125}I$; mezclar suavemente y cubrir el tubo con parafilm, incubar en hielo durante 10 minutos y mezclar después de 5 minutos.

c) Agregar 440 μ l de la solución de gelatina al 0.1% en PBS.

d) Cargar la columna PD-10 con la mezcla anterior.

e) Agregar 700 μ l de la solución de gelatina al 0.1%/PBS al tubo que contenía los reactivos en el inciso b) y posteriormente pasarlos a la columna PD-10.

f) Colectar toda la solución en el tubo 1.

g) Agregar 0.6 ml x 2 (1.2 ml) gelatina al 0.1%/PBS y colectar la fracción en el tubo 2; de igual manera colectar cuatro fracciones más para hacer un total de 6 fracciones.

h) Contar la radioactividad en 20 μ l de cada una de las fracciones. Posteriormente, combinar las fracciones 3 y 4 (con la máxima

radioactividad) y determinar la radioactividad en el contador de radiación Gamma (Cobra-Auto-Gamma, Packard Instrument Co.).

4. Precipitación con ácido tricloroacético.

a) Colocar 20 μl de la mezcla de las fracciones 3 + 4 en un tubo eppendorf en un baño de hielo y mezclarlo con 980 μl de una solución de ácido tricloroacético al 10% en medio de cultivo con suero fetal bovino (100 μl de ácido tricloroacético más 900 μl de medio de cultivo conteniendo 10% de suero fetal bovino). Incubar en hielo durante 30 minutos, centrifugar y determinar las cuentas por minuto en el pellet y en el sobrenadante.

Calcular la Actividad Específica.

$$\frac{(\text{Oncotoxina}^* \times 10^6 \text{ cpm})}{2.2 \times 10^6 \text{ cpm}} \times \frac{(1 \mu\text{Ci})}{\text{Oncotoxina} (\mu\text{g})} = \frac{{}^{125}\text{I} (1 \mu\text{Ci})}{\text{Oncotoxina} (\mu\text{g})}$$

$$\text{Oncotoxina}^* = \text{Oncotoxina-}^{125}\text{I}$$

2.2 Ensayo de radioreceptores de la oncotoxina-¹²⁵I en células de linfoma histiocítico humano (U-937)

1. Células del linfoma histiocítico (U-937) se utilizan a una densidad de 1×10^6 células/pozo en 100 μ l de medio de cultivo RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino, en 18 pozos de una placa flexible de 96 pozos con fondo en "U". Mantener las células en baño de hielo.
2. Preparar una solución stock de la oncotoxina marcada con ¹²⁵I de 2×10^6 cpm/100 μ l.
3. Preparar una solución stock de la oncotoxina no radioactiva de 1 μ M.
4. Preparar diluciones seriadas de la oncotoxina no radioactiva para obtener concentraciones de 1000 nM, 100 nM, 10 nM y 1 nM, mezclarlas con la proteína marcada con ¹²⁵I. Mantener todas las soluciones en baño de hielo.
5. Centrifugar la placa con células a 1000 rpm durante 1 minuto a 4° C y remover el sobrenadante.
6. Agregar 100 μ l de las soluciones de cada uno de los tratamientos (por triplicado).
7. Incubar la placa durante 1 hora en baño de hielo.
8. Centrifugar la placa a 1000 rpm durante 1 minuto a 4° C y remover el sobrenadante, colocando el material radioactivo en un contenedor especial para desecho radioactivo.
9. Lavar las células 3 veces con 100 μ l de medio de cultivo RPMI-1640 previamente enfriado, mezclando, centrifugando y removiendo el sobrenadante. Después del último lavado colocar la placa en una estufa a 70° C durante 15 minutos.

10. Cortar el fondo de cada uno de los pozos de la placa 96 de cada uno de los tratamientos, colocarlos en un tubo de plástico y *determinar las cpm en un contador de radiación gamma (64).*

2.3 Activación del factor de transcripción NF- κ B por la oncotoxina en células del linfoma histiocítico (U-937)

Tratamiento de las células.

1. Contar las células U-937 y centrifugarlas para coleccionar el paquete celular. Resuspenderlas en medio de cultivo fresco (RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino) para obtener una concentración celular de 1×10^6 /ml. Transferir 1 ml de la suspensión celular en placas de 24 pozos para el tratamiento con la oncotoxina (0, 10 y 50 μ g/ml). Mezclar las células con la micropipeta P-1000 después de haber agregado la oncotoxina.
2. Incubar a 37°C durante el tiempo deseado.
3. Mientras las células se están incubando, marcar tubos eppendorf y colocarlos en baño de hielo.
4. Después de que se ha completado el período de incubación, transferir las células a los tubos eppendorf previamente enfriados.

2.3.1 Preparación del extracto nuclear y citoplásmico.

Todos los subsecuentes pasos deben efectuarse en baño de hielo.

1. Centrifugar los tubos eppendorf en una microcentrifuga refrigerada a la máxima velocidad durante 1 minuto. Remover el sobrenadante, cuidando de no perder el paquete celular.

2. Adicionar 1 ml de PBS previamente enfriado en hielo, resuspender las células con la ayuda de una micropipeta P-200.
3. Centrifugar y aspirar el sobrenadante como en el paso #1.
4. Agregar 100 μ l de buffer de lisis previamente enfriado en baño de hielo y resuspender el paquete celular.
5. Incubar la suspensión celular durante 15 minutos en baño de hielo.
6. Adicionar 3.1 μ l de NP-40 al 10%.
7. Agitar vigorosamente la suspensión celular durante 45 segundos utilizando el vortex.
8. Centrifugar durante a 13 000 rmp durante 2 minutos. Remover el sobrenadante (extracto citoplásmico) con ayuda de una P-200.
9. Transferir el extracto citoplásmico a un tubo eppendorf previamente enfriado en baño hielo y conservarlo a -70°C .
10. Asegurarse de que el sobrenadante (extracto citoplásmico) ha sido completamente removido.
11. Agregar 20 μ l del buffer de extracción nuclear previamente enfriado en baño de hielo.
12. Incubar en baño de hielo durante 30 minutos, agitando constantemente en vortex.
13. Centrifugar a 13 000 rpm durante 5 minutos.
14. Transferir el extracto nuclear a un tubo eppendorf previamente enfriado en baño de hielo. Utilizar de 2 a 3 μ l para la determinación de proteínas.
15. Congelar el extracto nuclear en nitrógeno líquido y almacenar a -70°C .

Marcaje radioactivo del extremo 5' del oligonucleótido del NF- κ B.

El oligonucleótido NF- κ B (wild-type) utilizado para EMSA es una secuencia de 45-mer derivada del HIV-LTR que contiene dos sitios de unión para el NF- κ B (GIBCO-BRL). Las secuencias son las siguientes:

NF-5' (5'TTG TTA CAA GGG ACT TTC CGC TGG GGA CTT TCC AGG GAGGCG TGG 3')

NF-3' (5'CCA CGC CTC CCT GGA AAG TCC CCA GCG GAA AGT CCC TTG TAA CAA 3')

Se prepara una solución stock a una concentración de 1 000 pmoles/ml en agua destilada estéril y almacenarlos a -20°C.

Marcaje radioactivo:

1. Descongelar en hielo los oligonucleótidos, γ ³²P-ATP, buffer de T4 polynucleótido quinasa. Mezclar los siguientes componentes en un tubo eppendorf en baño de hielo: 2 μ l de NF-5' o NF-3' (2 pmoles), 5 μ l del buffer T4 polynucleótido quinasa al 10X (1X), 37 μ l de agua destilada, 2 μ l de γ -³²P-ATP (200 μ Ci), 4 μ l T4 polynucleótido quinasa.
2. Mezclar y centrifugar. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
3. Detener la reacción agregando 2 μ l de EDTA al 0.5M, pH 8.0 y colocar en baño de hielo.
4. Preparar una columna desechable de 5 ml Bio-Rad. Colocar una columna (esterilizada) en un tubo de 50 ml Falcon con un orificio en su tapa para fijar la columna. Empaquetar aproximadamente 5 ml de Sephadex G-50 (hasta el cuello de la columna).

5. Centrifugar la columna manteniéndola en el soporte improvisado del tubo Falcon de 50 ml a 2 000 rpm durante 4 minutos a temperatura ambiente.
6. Detener la centrifuga exactamente a los 4 minutos.
7. Retirar la columna y transferirla a otro estante improvisado que ahora va a contener un tubo eppendorf para coleccionar el material de elución.
8. Aplicar la mezcla de reacción en la columna.
9. Para la elución, centrifugar exactamente como en el paso #5. El material eluido contiene al oligonucleótido marcado con ^{32}P .
10. Todo el γ ^{32}P -ATP que no ha sido incorporado es atrapado en la columna. Por lo que habra que depositarla en el contenedor especial para basura radioactiva.
11. Determinar las cpm del material eluido. Un buen marcaje podría darnos entre 7 a 9 x 10⁶ cpm. Lo que significa que la actividad específica del oligo podría ser de 3.5 a 4.5 x 10⁶ cpm/pmole.
12. Agregar 1ml del oligonucleótido complementario correspondiente de una concentración de 100 pmoles/ml. Por ejemplo, si se utilizó el oligonucleótido NF-5' para marcarse con ^{32}P , entonces utilizar el oligo NF-3'. Utilizar un exceso de 20 a 50 molar del oligonucleótido complementario sin marcar, para asegurarse de una completa conversión de una simple cadena radioactiva a una doble cadena de oligonucleótido.
13. Hervir en baño de agua durante 3 minutos. Centrifugar. (Desnaturalización).
14. Dejar incubandose a temperatura ambiente durante 15 a 30 minutos. (Alineación).

15. Transferir a un baño de hielo. Diluir a una concentración de 4 fmole/ml utilizando agua destilada estéril. Esto es si se utilizaron 2 pmoles para el marcaje radioactivo y para la alineación, y si se diluye a 500 μ l que podría ser de una concentración de 4 fmoles/ml. Almacenar a -20°C .

2.3.2 EMSA. Ensayo del cambio de movilidad electroforética

Preparación del gel de poliacrilamida.

1. Montar las placas de vidrio para la electroforesis. Preparar un gel de poliacrilamida al 7.5% mezclando: 12.5 ml de acrilamida:bis (29.2:0.8), 10 ml EMSA buffer al 5X, 27.06 ml de agua bidestilada, 0.40 ml persulfato de amonio al 10%, 0.04 ml TEMED.
2. Dejar polimerizar el gel durante 30 a 45 minutos.
3. Ya que ha polimerizado, remover el peine y el espaciador del fondo del gel. Enjuagar con agua. Fijar el gel a la cámara. Agregar buffer EMSA 1X y remover burbujas de aire del fondo del gel.
4. Precorrer el gel en buffer EMSA 1X a 150V (\sim 40mA) a una temperatura ambiente durante 30 minutos como mínimo.

Reacción de unión.

1. Sacar el extracto nuclear del congelador de -70°C , y dejarlo descongelar en baño de hielo.
2. Preparar la reacción de unión al mezclar los siguientes componentes en un tubo eppendorf: 6 μ l de agua destilada, 2 μ l del buffer de unión al 10X, 2 μ l de poly dl:dC (1 μ g/ μ l), 4 μ l del oligonucléotido NF- κ B- ^{32}P y 2 μ l de NP-40.
3. Agregar 4 μ l del extracto nuclear a la mezcla anterior. Mezclar.

4. Centrifugar (pulse spin) en una microcentrifuga refrigerada.
5. Incubar en un baño de agua a 37°C durante 15 minutos.
6. Transferir los tubos a un baño con hielo. Agregar 4µl del buffer de muestras para DNA, mezclar, centrifugar rápidamente y transferir de nuevo en un baño con hielo.
7. Detener el precorrimento del gel.
8. Cargar las muestras en el gel y correr la electroforesis a 150 V (40 mA) durante 3 horas, hasta que el colorante azul de bromofenol haya migrado unos 2 cm cerca del fondo del gel.
9. Remover el gel de la cámara de electroforesis. Colocar una pieza de papel filtro sobre la superficie del gel, presionando uniforme y suavemente. Levantar cuidadosamente el gel que ahora esta firmemente adherido al papel filtro y cubrirlo con papel saran-wrap.
10. Colocar el gel en un desecador de geles a 80°C durante 1 hora.
11. Exponer el gel en una pantalla del PhosphorImager.
12. Analizar el gel en el Molecular-Dynamics PhosphorImager (65).

2.4 Análisis de la Fragmentación del DNA de células de linfoma histiocítico (U-937) en geles de agarosa

Después del tratamiento con la oncotoxina (0, 10, 50 100 µg de oncotoxina/ml durante 6, 12, 24, 48, 72 horas en una atmósfera de 95% de O₂ y 5% de CO₂ a 37°C), las células del linfoma histiocítico (1 X 10⁶ células/ml RPMI 1640 con 10% Suero Fetal Bovino) se centrifugaron, se lavaron con buffer de fosfatos salino y se resuspendieron en un volumen de 40 µl de buffer de lisis (tris-Cl 10mM pH=8.0, NaCl 100mM, EDTA 25 mM y SDS 0.5% conteniendo 20 µg de ribonucleasa A). Después de incubarse a 50°C durante 30 minutos, se les agregaron 1µl de Proteinasa

K (20 mg/ml) y se incubaron nuevamente a 50°C durante 30 minutos. Mezclar los 40 µl de muestra con 8 µl del buffer de muestras 6 X (0.025g bromophenol blue, 3 ml glycerol y 0.7 ml agua destilada) y se sometieron a un corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 5 X (242 g tris base, 57.1 ml ácido acético glacial, 100 ml EDTA 0.5M pH=8.0). Las bandas fueron visualizadas por tinción con bromuro de etidio (66).

2.5 Aislamiento del DNA Cromosomal de *Btt*

1. Inocular 100 ml de caldo nutritivo con la bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. Incubar a una temperatura de 30°C y en agitación constante hasta que el cultivo alcance su saturación.
2. Centrifugar a 4 000 rpm durante 10 minutos.
3. Resuspender el pellet bacterial en 9.5 ml de buffer TE (Tris al 10 mM pH=7.4 -7.5, EDTA al 1 mM pH=8), 0.5 ml de SDS al 10%, y 50 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Mezclar e incubar 1 hora a 37°C.
4. Agregar 1.8 ml de NaCl al 5M. Mezclar.
5. Agregar 1.5 ml de la solución CTAB (hexadecyltrimethyl ammonium bromide)/NaCl (CTAB al 10% en NaCl al 0.7 M) y mezclar. Incubar a 65°C durante 20 minutos.
6. Extraer con un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Centrifugar a 4 000 rpm durante 10 minutos.
7. Transferir la fase acuosa a otro tubo. Precipitar el DNA con 0.6 volúmenes de isopropanol. Lavar el precipitado con etanol al 70%. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en buffer TE.
8. Determinar la concentración de DNA (67).

2.6 Southern blot e hibridación del DNA de *Bacillus thuringiensis*

1. Después del corrimiento electroforético de las muestras de DNA, colocar el gel de agarosa en una solución de HCl al 0.25 M hasta que el colorante haya cambiado de color, y dejarlo en agitación durante 10 minutos adicionales.
2. Enjuagar el gel en agua destilada y colocarlo en una solución de desnaturalización (NaCl al 1.5 M, NaOH al 0.5 M) que lo cubra completamente. Dejarlo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Enjuagar el gel en agua destilada y colocarlo en una solución de neutralización (NaCl al 1.5 M, Tris-Cl al 0.5 M pH=7.2, EDTA al 0.001 M). Dejarlo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente (68).

2.6.1 Transferencia del DNA a la membrana de Hybond-N+

1. Llenar un contenedor de vidrio con el buffer de transferencia (20X SSPE). Preparar una plataforma y cubrirla con un puente hecho de tres piezas de papel filtro Whatman 3MM, saturados con el buffer de transferencia.
2. Colocar el gel sobre el puente de papel filtro evitando atrapar burbujas de aire. Cubrir con papel seran wrap alrededor del gel para evitar que el buffer sea absorbido directamente en las toallas de papel absorbente que se utilizaran más adelante.
3. Cortar una pieza de la membrana de Hybond-N+ (Catálogo RPN203 B, Amersham), al tamaño exacto del gel (previamente humedecida en agua destilada durante 5 minutos) y colocarla sobre la superficie del gel. Evitando atrapar burbujas de aire.

4. Colocar tres piezas de papel filtro 3MM, del mismo tamaño del gel y humedecidas con el buffer de transferencia, sobre la superficie de la membrana de nitrocelulosa.
5. Colocar un stack de toallas de papel absorbente, de aproximadamente 5 cm de altura, sobre el papel filtro 3MM.
6. Colocar una placa de vidrio sobre el tope de las toallas de papel además de algún objeto que pese entre 0.75 a 1 kg. Permitir que proceda la transferencia durante 16 horas.
7. Después de que se ha efectuado la transferencia desmonte cuidadosamente el sistema. Marcar la membrana con un lápiz para permitir la identificación de las pozos.
8. Lavar la membrana en el buffer 2X SSPE para remover cualquier residuo de agarosa (68).

2.6.2 Fijación del DNA

1. Fijar a una temperatura de 80°C durante 2 horas (68).

2.6.3 Protocolo de hibridación del DNA

1. Preparar una solución de prehibridación como sigue:

Solución	Volumen	Concentración Final
20 X SSPE	6.25 ml	5 X SSPE
100 X Denhardt's	1.25 ml	5 X Denhardt's
10% (w/v) SDS	1.25 ml	0.5 % (w/v) SDS

Ajustar a un volumen de 25 ml con agua destilada. Agregar a la membrana en una bolsa o recipiente para hibridación.

2. Desnaturalizar 0.5 ml de una solución de 1 mg/ml de DNA no homólogo al calentarlo a 100⁰C durante 5 minutos. Enfriar en hielo y agregarlo a la solución de prehibridización.
3. Prehibridizar a 50⁰C durante 1 hora en agitación constante.
4. Desnaturalizar la sonda radioactiva (a menos de que se vaya a utilizar DNA o RNA de una sola cadena) a 100⁰C durante 5 minutos. Agregar la sonda a la solución de prehibridización.
5. Incubar por lo menos durante 12 horas a 50⁰C en agitación constante.
6. Después de que se ha completado el tiempo de hibridación, lavar la membrana en una solución de SSPE 2X, SDS al 0.1% durante 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación.
7. Secar la membrana a temperatura ambiente sobre papel filtro. Cubrirla con seran wrap.
8. Exponer la membrana en un film de rayos X durante 12 a 16 horas a -70⁰C en una pantalla intensificadora
9. Efectuar la autoradiografía (68).

CAPITULO 3

Resultados

3.1 Marcaje Radioactivo de la Oncotoxina con ^{125}I

La oncotoxina fue marcada radioactivamente con ^{125}I mediante el método de yodogen; 81% del total de la radioactividad se unió a la oncotoxina de *Btt* (Figura 6). La actividad específica de la oncotoxina- ^{125}I fue de 48 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ de proteína.

Determinación de las cuentas por minuto (cpm) de las fracciones durante el proceso de la yodinación de la oncotoxina:

Fracción No.	cpm
1	38
2	445
3	5257743
4	3212373
5	1406247
6	1087363
3+4	4419906

$4.4 \times 10^6 \text{ cpm}/20 \mu\text{l} = 528 \times 10^6 \text{ cpm}/2400 \mu\text{l}/5 \mu\text{g}$ oncotoxina.

Actividad específica = 48 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ oncotoxina.

Cuentas precipitables con ácido tricloroacético:

Fracción	cpm	% de incorporación de ^{125}I a la oncotoxina
Pellet	3785560	81%
Sobrenadante	909223	19%

3.2 Ensayo de radioreceptores de la oncotoxina-¹²⁵I en células de linfoma histiocítico (U-937)

En la Figura 7 se muestra la curva de competición para la unión de la oncotoxina-¹²⁵I en presencia de concentraciones crecientes de la oncotoxina no radioactiva. La unión fue saturable con la proteína no radioactiva en un rango de 1 a 1 000 nM.

3.3 Activación del factor de transcripción NF-κB por la oncotoxina en células del linfoma histiocítico humano (U-937)

Determinamos la activación del factor de transcripción NF-κB por la oncotoxina en células del linfoma histiocítico humano U-937 mediante EMSA. Como se muestra en la Figura 9 y 10 el factor de transcripción NF-κB fue activado por la oncotoxina a una dosis de 10 μg/ml hasta las 24 horas de tratamiento. Similar a lo que sucede al utilizar TNF a una dosis de 10 pM como control positivo.

3.4 Análisis de la fragmentación del DNA de células de linfoma histiocítico humano (U-937)

En la Figura 11 observamos una fotografía al microscopio óptico de las células U-937 bajo el proceso de apoptosis después de haber sido tratadas con diferentes concentraciones de la oncotoxina. Analizamos el DNA aislado de las células del linfoma histiocítico (U-937) de diferentes tratamientos con la oncotoxina mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Los resultados de la Figura 12 y 13 claramente indican que la oncotoxina induce la fragmentación del DNA, una de las principales características de muerte celular por

apoptosis. Observando que la mínima dosis de la oncotoxina para inducir la fragmentación del DNA es de 10 µg/ml durante 72 horas.

3.5 Aislamiento del DNA cromosomal de *Btt*.

El DNA cromosomal de la bacteria de *Btt* se purificó mediante un protocolo básico que nos permite aislarlo libre de polisacáridos y proteínas contaminantes mediante una selectiva precipitación con CTAB (Hexadecyltrimethyl ammonium bromide). Además el DNA de *Btt* se sometió a un tratamiento a 65°C durante 10 minutos para comprobar que este libre de enzimas contaminantes. También se digirió con diferentes enzimas de restricción, ECOR1 y Sau3A1, para crear una librería de DNA disponible para detectar el gen de la oncotoxina mediante ensayos de hibridación utilizando una sonda radioactiva con ³²P (Figura 15) preparada en base a la secuencia de los aminoácidos de la porción amino terminal de la oncotoxina.

3.6 Souther blot hibridación del DNA de *Btt*

Se aisló DNA cromosomal de diferentes serotipos de *Bacillus thuringiensis* y mediante southern blot hibridación con el oligonucleótido radioactivo de la oncotoxina encontramos que la secuencia de la oncotoxina no sólo esta presente en el DNA de *Btt* sino también en otros serotipos de *Bacillus thuringiensis* (Figura 16).

CAPITULO 4

DISCUSION

El mecanismo de acción a través del cual las proteínas derivadas de *Bacillus thuringiensis* matan células tumorales se desconoce, pero se ha sugerido que estas proteínas se unen a receptores específicos de membrana formando poros que alteran la permeabilidad de la misma, ocasionando lisis celular (Vadlamudi, R. K. et al, 1995). Mediante ensayos de unión por competencia demostramos que la unión de la oncotoxina-¹²⁵I a las células del linfoma histiocítico humano (U-937) puede ser inhibida competitivamente por la oncotoxina sin marca radioactiva. Esto nos sugiere una interacción específica de la oncotoxina a receptores de la membrana celular. Estudios similares efectuados por Hofmann, C. et al, 1988 han reportado que delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner* marcada con ¹²⁵I se unió a sitios de unión específicos o receptores de una manera saturable y con una alta afinidad en membranas de la microvellosidad apical del intestino medio de larvas de *Manduca sexta* y *Pieris brassicae*, con una directa relación entre toxicidad y sitios de unión específica. Así mismo, Vadlamudi, R. K. et al., 1995, mediante experimentos de unión por competencia demostraron que las membranas de la microvellosidad apical de las larvas de *Manduca sexta* presentan dos sitios de unión para las proteínas cry1A de *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*; uno que reconoce a todas las tres toxinas cry1A (a), cry1A (b) y cry1A (c), y el otro que reconoce solamente cry1A (b). Posiblemente una glicoproteína este involucrada en la unión de las proteínas de *Bacillus thuringiensis* a las membranas de las células sensibles (Hofman et al, 1986). Los mayores avances en el esclarecimiento de la naturaleza bioquímica muestran que las proteínas

de unión para las toxinas cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac y cry1C en *Manduca sexta* (Knight *et al.*, 1994; Sangadala *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1996), *Heliothis virescens* (Gill *et al.*, 1995), *Lymantria dispar* (Valaitis *et al.*, 1995), *Plutella xylostella* (Denolf *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1997) y *Bombyx mori* (Yaoi *et al.*, 1997), son miembros de la familia de las aminopeptidasas de tipo N con peso molecular cercano a 120 kDa. Se conoce muy poco acerca de la actividad citotóxica de las proteínas de *Bacillus thuringiensis* en contra de las células tumorales; la oncotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* es citotóxica contra una amplia variedad de células tumorales humanas, sin afectar células normales (Cristina Rodríguez *et al.*, 1996 datos no publicados). Como la oncotoxina puede distinguir células normales de células tumorales tampoco está entendido. Yokoyama *et al.*, 1991 han demostrado que una proteína de 25 kDa de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* es citotóxica a células tumorales murinas y que además potencia el efecto citotóxico de ciertos agentes antitumorales tanto *in vivo* como *in vitro*. Se ha demostrado que las proteínas derivadas de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* son citotóxicas a células tumorales murinas tanto *in vivo* como *in vitro* (Prasad and Shethna, 1973,1974). Al igual que una gran variedad de moléculas la oncotoxina es capaz de activar el factor nuclear de la transcripción NF- κ B que controla la expresión de una gran variedad de genes esenciales en la respuesta inmune e inflamatoria. El NF- κ B participa como una señal de transducción y activación de genes en el proceso de muerte celular programada; señales apoptóticas conducen a su activación, y el factor de transcripción NF- κ B activado induce la transcripción de genes cuyos productos son requeridos para llevar a cabo el proceso de apoptosis (Grimm, S. *et al.*, 1996). Lo cual explicaría el mecanismo de acción de la oncotoxina al inducir la fragmentación del DNA en células del linfoma

histiocítico (U-937), una de las características de muerte celular por apoptosis. Este proceso representaría un blanco ideal para la intervención terapéutica de las enfermedades humanas, no sólo cáncer, sino también en enfermedades virales, degeneración neuronal, linfoproliferación, inflamación, inmunodeficiencias, entre otras; ya que se han identificado una gran variedad de moléculas que son capaces de activar la apoptosis como punto final de la biología celular, tanto in vivo como in vitro. Nos preguntamos que sistema efector es activado debido a la interacción de la oncotoxina a receptores específicos para inducir la activación del NF- κ B y la fragmentación del DNA en las células del linfoma histiocítico humano (figura 14).

El gen para la oncotoxina no solamente está presente en el DNA genómico de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*, sino también en diferentes serotipos; *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, *Bacillus thuringiensis* var. *sotto*, presentan secuencias similares a la oncotoxina, permitiéndonos considerar el uso de las proteínas del cristal de *Bacillus thuringiensis* para propósitos terapéuticos.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

1. La oncotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* se une a receptores específicos en membrana de las células del linfoma histiocítico humano (U-937).
2. La oncotoxina activa el factor de la transcripción NF- κ B en las células U-937.
3. La oncotoxina induce fragmentación del DNA de las células U-937, una de las principales características de muerte celular por apoptosis.
4. La secuencia de la oncotoxina no sólo esta presente en el DNA cromosomal de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* sino también en otros serotipos de *Bacillus thuringiensis* (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, *Bacillus thuringiensis* var. *sotto*).

Tabla I
Caracterización Biológica y Fisicoquímica de la Oncotoxina

Fuente: *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*

Actividad citotóxica: linfoma histiocítico (U-937)
leucemia monocítica aguda (THP-1)
leucemia promielocítica (HL-60)
leucemia aguda de células T (Jurkat)
linfoma de Burkitt (Raji)
leucemia mielogena crónica (K-562)
carcinoma hepatocelular (Hep-3B)
carcinoma hepatocelular (Hep-G2)
adenocarcinoma de mama (MCF-7)
adenocarcinoma de mama (CLO)
adenocarcinoma de ovario (OVCA-429)
adenocarcinoma de ovario (OVCA-432)
adenocarcinoma de ovario (OVCA-433)

Proteólisis: Sensible a tripsina, quimiotripsina y pronasa.

Estabilidad al pH: Sensible a condiciones ácidas (pH < 4).

Termoestabilidad: Estable a 100°C durante 30 minutos.

Peso molecular: 20 kDa.

Nomenclatura de las toxinas de *Bacillus thuringiensis*

Tabla II. Lista actualizada de los genes de las delta-endotoxinas*

Nombre	Clave de Acceso al Banco de Genes	Referencia	Año	Revista	Código
cryIAa1	M11250	Schnepf et al	1985	JBC 260 6264-6272	527-4054
cryIAa2	M10917	Shibano et al	1985	Gene 34 243-251	153->2955
cryIAa3	D00348	Shimizu et al	1988	ABC 52 1565-1573	73-3603
cryIAa4	X13535	Masson et al	1989	NAR 17 446-446	1-3528
cryIAa5	D17518	Udayasuriyan et al	1994	BBB 58 830-8358	1-3611
cryIAa6	U43605	Masson et al	1994	Mol Micro 14 851-860	1->1860
cryIAb1	M13898	Wabiko et al	1986	DNA 5 305-314	142-3606
cryIAb2	M12661	Thorne et al	1986	J Bact 166 801-811	155-3625
cryIAb3	M15271	Geiser et al	1986	Gene 48 109-118	156-3623
cryIAb4	D00117	Kondo et al	1987	ABC 51 455-463	163-3630
cryIAb5	X04698	Hofte et al	1986	EJB 161 273-280	141-3605
cryIAb6	M37263	Hefford et al	1987	J Biotech 6 307-322	73-3540
cryIAb	X13233	Haider & Ellar	1988	NAR 16 10927-10927	1-3465
cryIAb8	M16463	Oeda et al	1987	Gene 53 113-119	157-3624
cryIAb9	X54939	Chak & Jen	1993	PNSCRC 17 7-14	73-3540
cryIAb10	A29125	Fischhoff et al	1987	Bio/ technology	5 807-813sec pérido
cryIAc1	M11068	Adang et al	1985	Gene 36 289-300	388-3921
cryIAc2	M35524	Von Tersch et al	1991	AEM 57 349-358	239-3772
cryIAc3	X54159	Dardenne et al	1990	NAR 18 5546-5546	339->2192
cryIAc4	M73249	Payne et al	1991	USP 4990332	1-3537
cryIAc5	M73248	Payne et al	1992	USP 5135867	1-3534
cryIAc6	U43606	Masson et al	1994	Mol Micro 14 851-860	1->1821
cryIAc7	U87793	Herrera et al	1994	AEM 60 682-690	976-4512
cryIAc8	U87397	Omolo et al	1997	Curr Micro 34 118-121	153-3686
cryIAc9	U89872	Gleave et al	1992	NZJCHS 20 27-36	388-3921
cryIAc10	AJ002514	Sun and Yu	1997	no publicado	388-3921
cryIAd1	M73250	Payne & Sick	1993	USP 5246852	1-3537
cryIAe1	M65252	Lee & Aronson	1991	J Bact 173 6635-6638	81-3623
cryIAf1	U82003	Kang et al	1997	no publicado	172->2905
cryIBa1	X06711	Brizzard & Whiteley	1988	NAR 16 2723-2724	1-3684
cryIBa2	X95704	Soetaert	1996	no publicado	186-3869
cryIBb1	L32020	Donovan et al	1994	USP 5322687	67-3753
cryIBe1	Z46442	Bishop et al	1994	no publicado	141-3839
cryIBd1	U70726	Chak	1996	no publicado	
cryIBe1		Payne et al	1998	USP 5723758	1-3681
cryICa1	X07518	Honee et al	1988	NAR 16 6240-6240	47-3613
cryICa2	X13620	Sanchis et al	1989	Mol Micro 3 229-238	241->2711
cryICa3	M73251	Payne & Sick	1993	USP 5246852	1-3570
cryICa4	A27642	Van Mellaert et al	1990	EP 0400246	234-3800
cryICa5	X96682	Strizhov	1996	no publicado	1->2268
cryICa6	X96683	Strizhov	1996	no publicado	1->2268

Nomenclatura de las toxinas de *Bacillus thuringiensis*
Continuación Tabla II

Nombre	Clave de Acceso al Banco de Genes	Referencia	Año	Revista	Código
cry1Ca7	X96684	Strizhov	1996	no publicado	1->2286
cry1Cb1	M97880	Kalman et al	1993	AEM 59 1131-1137	296-3823
cry1Da1	X54160	Hofte et al	1990	NAR 18 5545-5545	264-3758
cry1Db1	Z22511	Lambert	1993	no publicado	241-3720
cry1Ea1	X53985	Visser et al	1990	J Bact 172 6783-6788	130-3642
cry1Ea2	X56144	Bosse et al	1990	NAR 18 7443-7443	1-3516
cry1Fa3	M73252	Payne & Sick	1991	USP 5039523	1-3516
cry1Ea4	U94323	Ibarra et al	1997	no publicado	388-3900
cry1Eb1	M73253	Payne & Sick	1993	USP 5206166	1-3522
cry1Fa1	M63897	Chambers et al	1991	J Bact 173 3966-3976	478-3999
cry1Fa2	Z22512	Lambert	1993	no publicado	483-4004
cry1Fb2	AB012288	Masuda & Asano	1998	no publicado	84-3587
cry1Ga1	Z22510	Lambert	1993	no publicado	67-3564
cry1Ga2	Y09326	Shevelev et al	1997	Febs Lett 404 148-152	692-4210
cry1Gb1	U70725	Chak	1996	no publicado	
cry1Ha1	Z22513	Lambert	1993	no publicado	530-4045
cry1Hb1	U35780	Koo	1995	no publicado	728-4195
cry1Ia1	X62821	Taylor et al	1992	Mol Micro 6 1211-1217	355-2511
cry1Ia2	M98544	Gleave et al	1993	AEM 59 1683-1687	1-2160
cry1Ia3	L36338	Shin et al	1995	AEM 61 2402-2407	279-2438
cry1Ia4	L49391	Kostichka et al	1996	J Bact 178 2141-2144	61-2217
cry1Ia5	Y08920	Selvapandiyan	1996	no publicado	524-2680
cry1Ia6	AF076953	Zhong et al	1998	no publicado	1-2157
cry1Ib1	U07642	Shin et al	1995	AEM 61 2402-2407	237-2393
cry1Ja1	L32019	Donovan et al	1994	USP 5322687	99-3519
cry1Jb1	U31527	V.Tersch & Gzz.	1994	USP 5356623	177-3686
cry1Ka1	U28801	Koo et al	1995	FEMS 134 159-164	451-4098
cry2Aa1	M31738	Donovan et al	1989	JBC 264 4740-4740	156-2054
cry2Aa2	M23723	W. & Whiteley	1989	J Bact 171 965-974	1840-3741
cry2Aa3	D86064	Sasaki et al	1997	Curr Micro 35 1-8	2007-3911
cry2Aa4	AF047038	Misra et al	1998	no publicado	10-1908
cry2Ab1	M23724	W. & Whiteley	1989	J Bact 171 965-974	1-1899
cry2Ab2	X55416	Dankocsik et al	1990	Mol Micro 4 2087-2094	874-2775
cry2Ac1	X57252	Wu et al	1991	FEMS 81 31-36	2125-3990
cry3Aa1	M22472	Herrnstadt et al	1987	Gene 57 37-46	25-1956
cry3Aa2	J02978	Sekar et al	1987	PNAS 84 7036-7040	241-2175
cry3Aa3	Y00420	Hofte et al	1987	NAR 15 7183-7183	566-2497
cry3Aa4	M30503	McPherson et al	1988	Bio/technology 6 61-66	201-2135
cry3Aa5	M37207	Donovan et al	1988	MGG 214 365-372	569-2503
cry3Aa6	U10985	Adams et al	1994	Mol Micro 14 381-38	569-2503
cry3Ba1	X17123	Sick et al	1990	NAR 18 1305-1305	25->1977
cry3Ba2	A07234	Peferoen et al	1990	EP 0382990	342-2297
cry3Bb1	M89794	Donovan et al	1992	AEM 58 3921-3927	202-2157
cry3Bb2	U31633	Donovan et al	1995	USP 5378625	144-2099

Nomenclatura de las toxinas de *Bacillus thuringiensis*
Continuación Tabla II

Nombre	Clave de Acceso al Banco de Genes	Referencia	Año	Revista	Código
cry3Ca1	X59797	Lambert et al	1992	Gene 110 131-132	232-2178
cry4Aa1	Y00423	Ward & Ellar	1987	NAR 15 7195-7195	1-3540
cry4Aa2	D00248	Sen et al	1988	ABC 52 873-878	393-3935
cry4Ba1	X07423	Chungjatpornchai et al	1988	EJB 173 9-16	157-3564
cry4Ba2	X07082	Tungpradubkul et al	1988	NAR 16 1637-1638	151-3558
cry4Ba3	M20242	Yamamoto et al	1988	Gene 66 107-120	526-3933
cry4Ba4	D00247	Sen et al	1988	ABC 52 873-878	461-3868
cry5Aa1	L07025	Sick et al	1994	USP 5281530	1->4155
cry5Ab1	L07026	Narva et al	1991	EP 0462721	1->3867
cry5Ac1	I34543	Payne et al	1997	USP 5596071	1->3660
cry5Ba1	U19725	Payne et al	1997	USP 5596071	1->3735
cry6Aa1	L07022	Narva et al	1993	USP 5236843	1->1425
cry6Ba1	L07024	Narva et al	1991	EP 0462721	1->1185
cry7Aa1	M64478	Lambert et al	1992	AEM 58 2536-2542	184-3597
cry7Ab1	U04367	Payne & Fu	1994	USP 5286486	1->3414
cry7Ab2	U04368	Payne & Fu	1994	USP 5286486	1->3414
cry8Aa1	U04364	Foncerrada et al	1992	EP 0498537	1->3471
cry8Ba1	U04365	Michaels et al	1993	WO 93/15206	1->3507
cry8Ca1	U04366	Ogiwara et al.	1995	Curr Micro 30 227-235	1-3447
cry9Aa1	X58120	Smulevitch et al	1991	FEBS 293 25-28	5807-9274
cry9Aa 2	X58534	Gleave et al	1992	JGM 138 55-62	385->3837
cry9Ba1	X75019	Shevelev et al	1993	FEBS 336 79-82	26-3488
cry9Ca1	Z37527	Lambert et al	1996	AEM 62 80-86	2096-5569
cry9Da1	D85560	Asano et al	1997	AEM 63 1054-1057	47-3553
cry9Da2	AF042733	Wasano & Ohba	1998	no publicado	<1->1937
cry10Aa1	M12662	Thorne et al	1986	J Bact 166 801-811	941-2965
cry11Aa1	M31737	Donovan et al	1988	J Bact 170 4732-4738	41-1969
cry11Aa2	M22860	Adams et al	1989	J Bact 171 521-530	<1-235
cry11Ba1	X86902	Delecluse	1995	AEM 61 4230-4235	64-2238
cry12Aa1	L07027	Narva et al	1991	EP 0462721	1->3771
cry13Aa1	L07023	Narva et al	1992	WO 92/19739	1-2409
cry14Aa1	U13955	Narva et al	1994	WO 94/16079	1-3558
cry15Aa1	M76442	Brown & Whiteley	1992	J Bact 174 549-557	1036-2055
cry16Aa1	X94146	Barloy et al	1996	J Bact 178 3099-3105	158-1996
cry17Aa1	X99478	Barloy et al	1998	Gene 211 293-299	12-1865
cry18Aa1	X99049	Zhang et al	1997	J Bact 179 4336-4341	743-2860
cry19Aa1	Y07603	Russo and Delecluse	1996	AEM 63 4449-4455	719-2662
cry19Ba1	D88381	Hwang et al	1998	SAB 21 179-184	626-2671
cry20Aa1	U82518	Lee & Gill	1997	AEM 63 4664-4670	60-2318
cry21Aa1	I32932	Payne et al	1996	USP 5589382	1-3501
cry22Aa1	I34547	Payne et al	1997	USP 5596071	1-2169
cyt1Aa1	X03182	Waalwijk et al	1985	NAR 13 8207-8217	140-886
cyt1Aa2	X04338	Ward & Ellar	1986	JMB 191 1-11	509-1255
cyt1Aa3	Y00135	Earp & Ellar	1987	NAR 15 3619-3619	36-782
cyt1Aa4	M35968	Galjart et al	1987	Curr Micro 16 171-177	67-816
cyt1Ab1	X98793	Thiery et al	1997	AEM 63 468-473	28-777
cyt1Ba1	U37196	Payne et al	1995	USP 5436002	1-795

Nomenclatura de las toxinas de *Bacillus thuringiensis*
Continuación Tabla II

Nombre	Clave de Acceso al Banco de Genes	Referencia	Año	Revista	Código
cyt2Ba1	U52043	Guerchicoff et al	1997	AEM 63 2716-2721	287-655
cyt2Aa1	Z14147	Koni & Ellar	1993	JMB 229 319-327	270-1046
cyt2Ba2	AF020789	Guerchicoff et al	1997	AEM 63 2716-2721	<1->469
cyt2Ba3	AF022884	Guerchicoff et al	1997	AEM 63 2716-2721	<1->469
cyt2Ba4	AF022885	Guerchicoff et al	1997	AEM 63 2716-2721	<1->469
cyt2Ba5	AF022886	Guerchicoff et al	1997	AEM 63 2716-2721	<1->471
cyt2Ba6	AF034926	Guerchicoff et al	1997	AEM 63 2716-2721	<1->472
cyt2Bh1	U82519	Cheong & Gill	1997	AEM 63 3254-3260	416-1204

*Tabla tomada de N. Crickmore, et al., 1998 (32).

Nota : Las siguientes toxinas o proteínas parecidas a toxinas no han sido incluidas en la nomenclatura debido a que no se encuentran dentro del cristal o porque no han presentado criterios satisfactorios para su inclusión.

Nombre	Acceso	Referencia	Año	Revista	Código
40kDa	M76442	Brown and Whiteley	1992	J Bact 174 549-557	45-971
cryC35	X92691	Juarez-Perez et al	1995	no publicado	1-981
cryTDK	D86346	Hashimoto	1996	no publicado	177-2645
cryC53	X98616	Juarez-Perez et al	1996	no publicado	1-1005
vip3A(a)	L48811	Estruch et al	1996	PNAS 93 5389-5394	739-3105
vip3A(b)	L48812	Estruch et al	1996	PNAS 93 5389-5394	118-2484
p21med	X98794	Thiery et al	1997	AEM 63 468-473	1-552

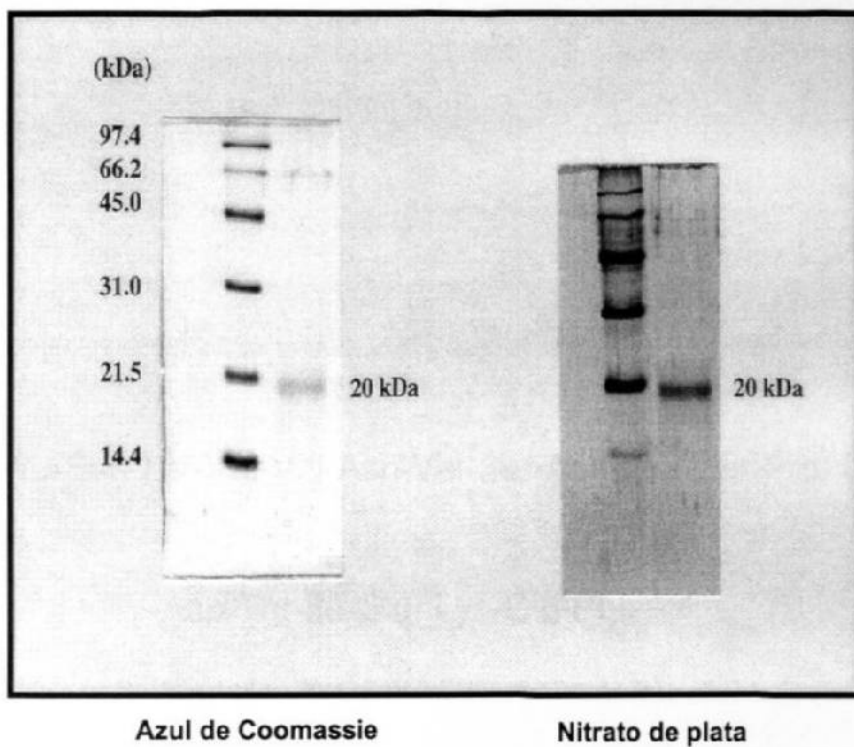


Figura 1. Electroforesis de la oncotoxina (20 kDa) de *Btt* en geles SDS-PAGE al 15%.

NH₂-Pro-Ser-Thr-Val-Val-Asn-Val-Ser-Asn-Leu-Lys-Pro- Gly

-Asp-Thr-Ile-Glu- Lys-Glu-Phe

Figura 2. Secuenciación de los aminoácidos de la porción amino terminal de la oncotoxina de Btt.

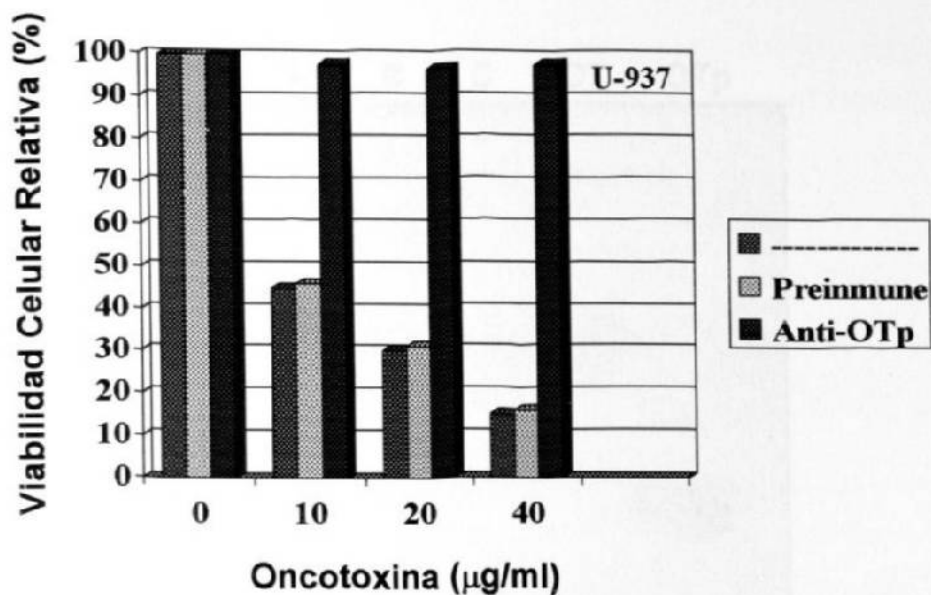


Figura 3. La actividad biológica de la oncotoxina es neutralizada por los anticuerpos específicos al péptido sintético de la oncotoxina. Un total de 5×10^3 células del linfoma histiocítico humano (U-937) se incubaron con diferentes dosis de oncotoxina (0, 10, 20 y 40 µg/ml) +/- anti-Otp durante 72 horas a 37°C. Durante las últimas 6 horas, las células fueron marcadas con timidina tritiada. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como el porcentaje de viabilidad celular relativa.

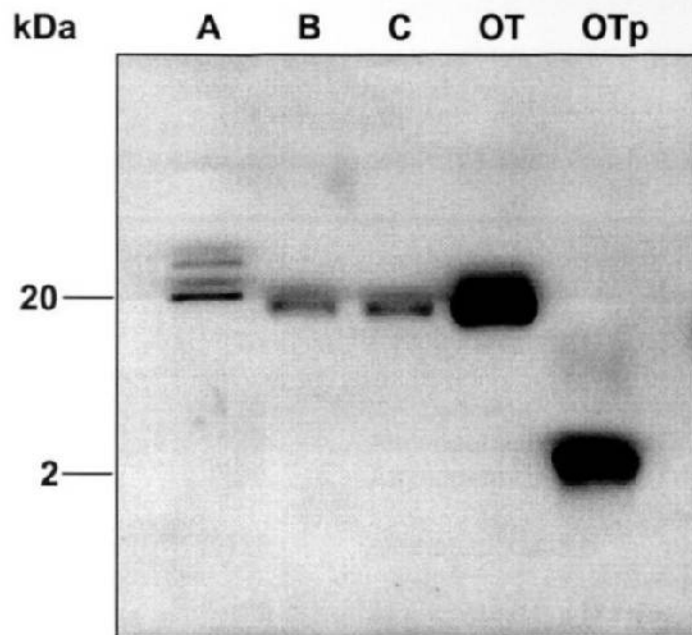


Figura 4. Análisis del western blot durante la purificación de la oncotoxina utilizando anticuerpos anti-Otp. La electroforesis de las proteínas se realizó en geles SDS-PAGE al 15%, después fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas con el anti-Otp. Posteriormente se le agregó el conjugado anti-conejo, unido a peroxidasa y revelado con el sistema de quimioluminiscencia ECL (Amersham). Carril A: cristal proteico de *Bft* solubilizado en condiciones alcalinas. Carril B y C: proteínas eluidas con 0.05 M de NaCl a través de una columna de intercambio iónico Mono-Q. OT: oncotoxina purificada. Otp: péptido de la oncotoxina.

Tabla III
Proteínas de unión y probables receptores para las δ -endotoxinas

Toxina	Insecto	Tamaño (kDa)	Identidad	Referencia
Cry1A	<i>Bombyx mori</i>	120	Aminopeptidasa N	Yaoi <i>et al.</i> , 1997
Cry1Ab	<i>Manduca sexta</i>	210	Caderina	Vadlamudi <i>et al.</i> , 1995
Cry1Ab	<i>Manduca sexta</i>	120	Aminopeptidasa N	Denolf <i>et al.</i> , 1996
Cry1Ab	<i>Plutella xylostella</i>	120	Aminopeptidasa N	Denolf <i>et al.</i> , 1996
Cry1Ac	<i>Manduca sexta</i>	120	Aminopeptidasa N	Knight <i>et al.</i> , 1994 Sangadala <i>et al.</i> , 1994
Cry1Ac	<i>Heliothis virescens</i>	120	Aminopeptidasa N	Gill <i>et al.</i> , 1995
Cry1Ac	<i>Lymantria dispar</i>	120	Aminopeptidasa N	Valaitis <i>et al.</i> , 1995
Cry1Ac	<i>Plutella xylostella</i>	120	Aminopeptidasa N	Luo <i>et al.</i> , 1997
Cry1C	<i>Manduca sexta</i>	106	Aminopeptidasa N	Luo <i>et al.</i> , 1996

Bacillus thuringiensis var. thuringiensis

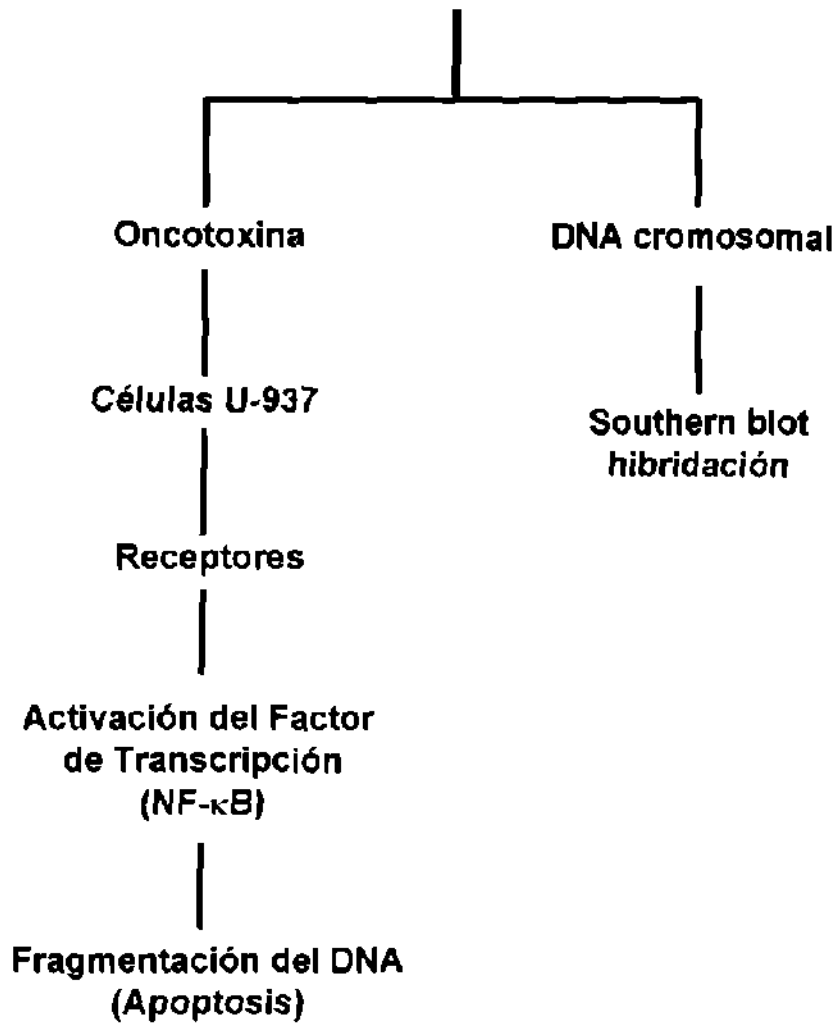


Figura 5. Diseño Experimental.

Tabla IV
Determinación de las cpm de las fracciones eluidas
durante el marcaje radioactivo de la oncotoxina con ¹²⁵I

Fracción No.	^(125I) cpm
1	38
2	445
*3	5257743
*4	3212373
5	1406247
6	1087363
*3+4	4419906

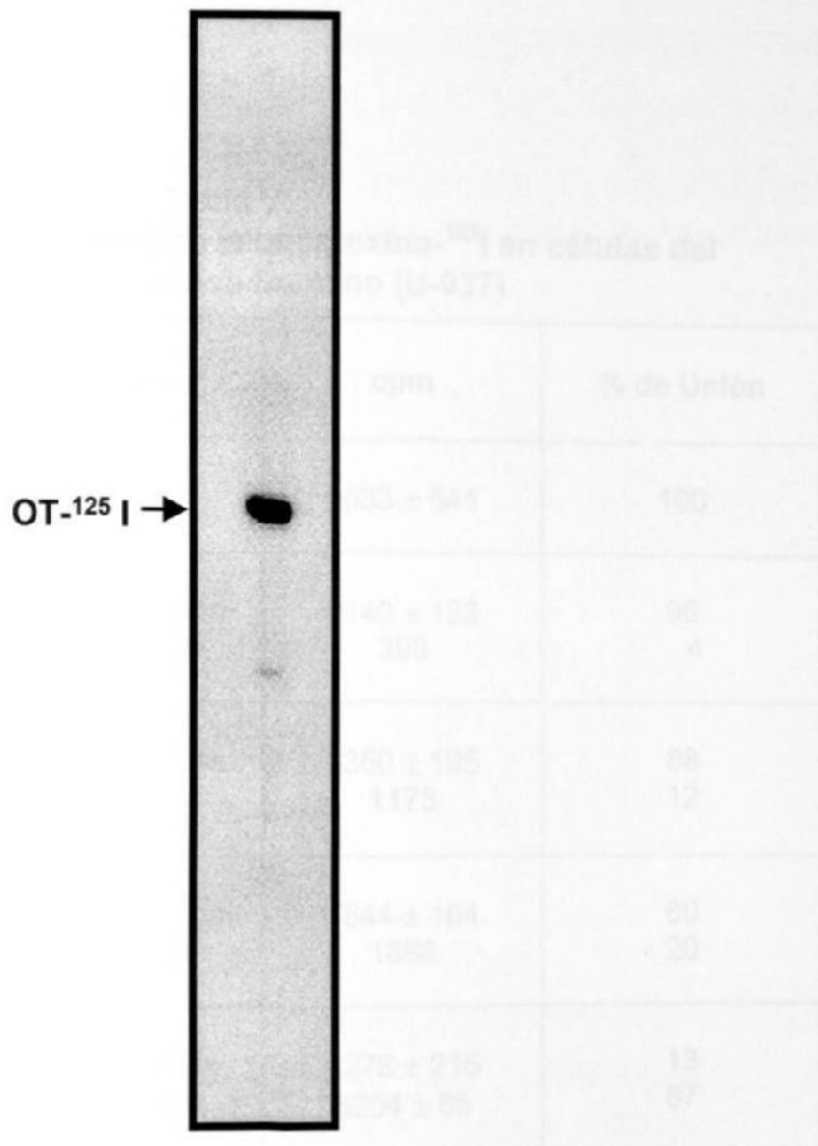


Figura 6. Autoradiograma de la oncotoxina marcada con ¹²⁵I. La electroforesis de la oncotoxina-¹²⁵I se realizó en geles SDS-PAGE al 15%, el gel se desecó a 80°C durante 1 hora, se expuso a una pantalla y se analizó en un Molecular-Dynamics PhosphorImager.

Tabla V
Ensayo de radioreceptores de la oncotoxina-¹²⁵I en células del
linfoma histiocítico humano (U-937)

Tratamiento	Unión	cpm	% de Unión
OT- ¹²⁵ I	Total	9533 ± 541	100
OT- ¹²⁵ I + Δ 1nM	No Especifica Específica	9140 ± 123 393	96 4
OT- ¹²⁵ I + Δ10 nM	No Especifica Específica	8360 ± 195 1173	88 12
OT- ¹²⁵ I + Δ100 nM	No Especifica Específica	7644 ± 164 1888	80 20
OT- ¹²⁵ I + Δ1000 nM	No Especifica Específica	1278 ± 215 8254 ± 85	13 87

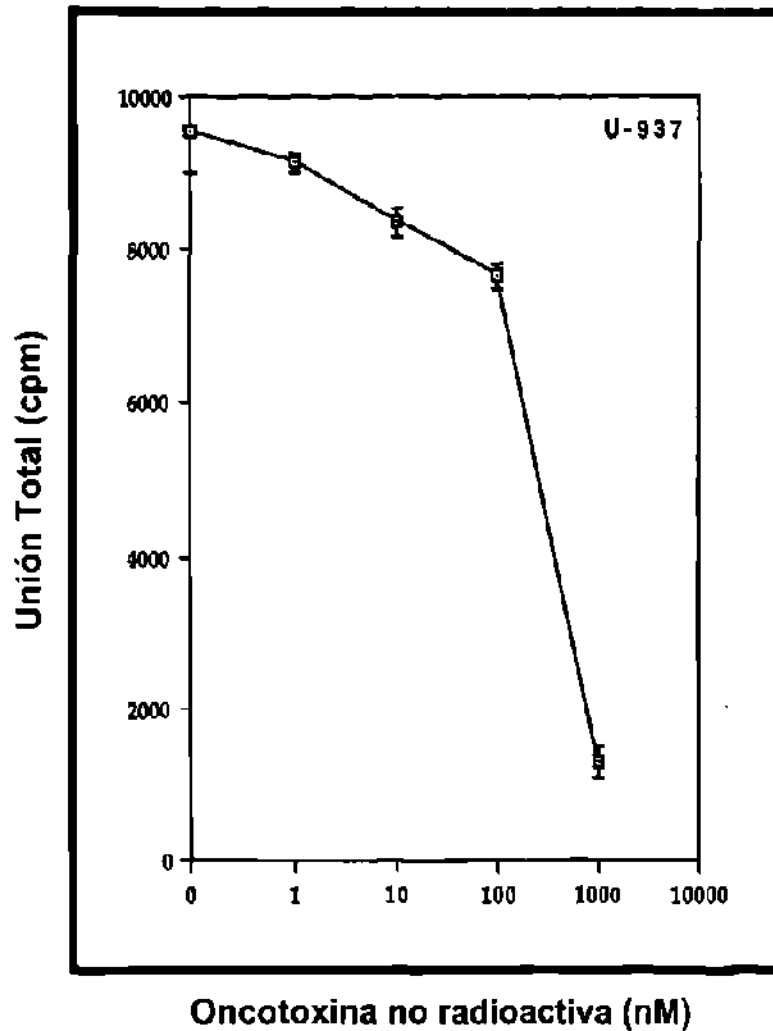


Figura 7. Unión competitiva de la oncotoxina-¹²⁵I y de la oncotoxina no radioactiva a células del linfoma histiocítico humano (U-937). Un total de 1×10^6 células U-937 se incubaron con la oncotoxina-¹²⁵I y con una mezcla de la oncotoxina-¹²⁵I y diferentes concentraciones de la oncotoxina no radioactiva en placas de 96 pozos, se incubaron en baño de hielo durante 1 hora, se lavaron y posteriormente se trataron a 70°C durante 15 minutos. Se determinó las cpm de cada uno de los tratamientos en un gamma counter.

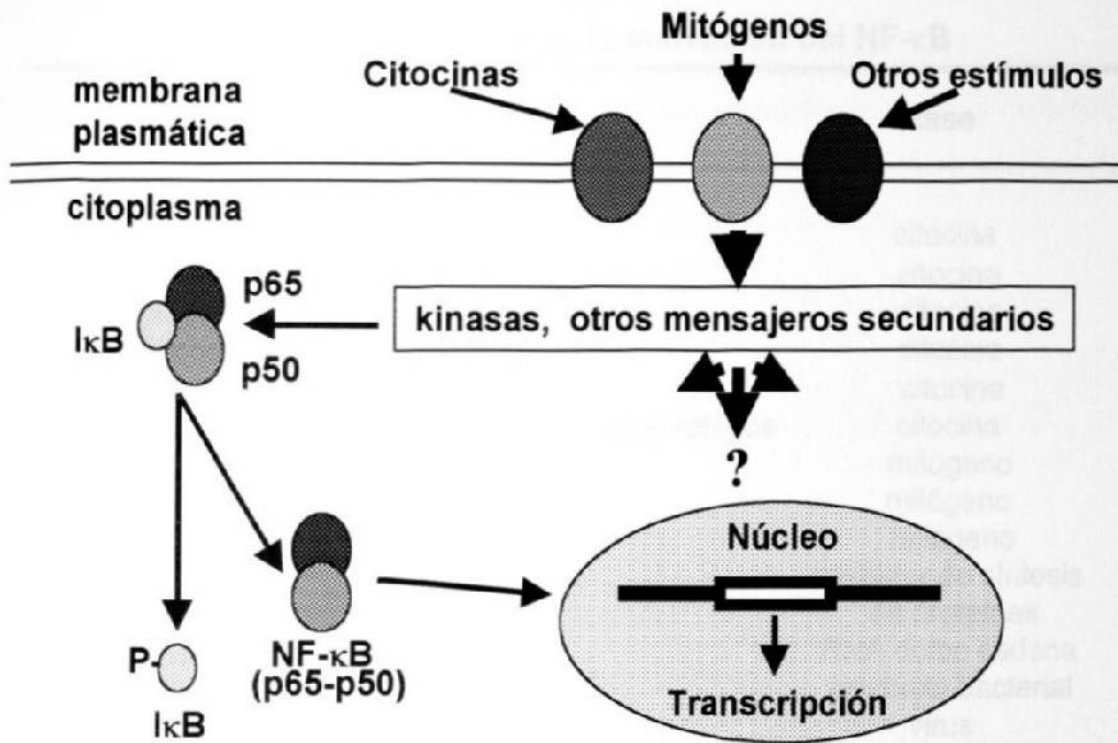


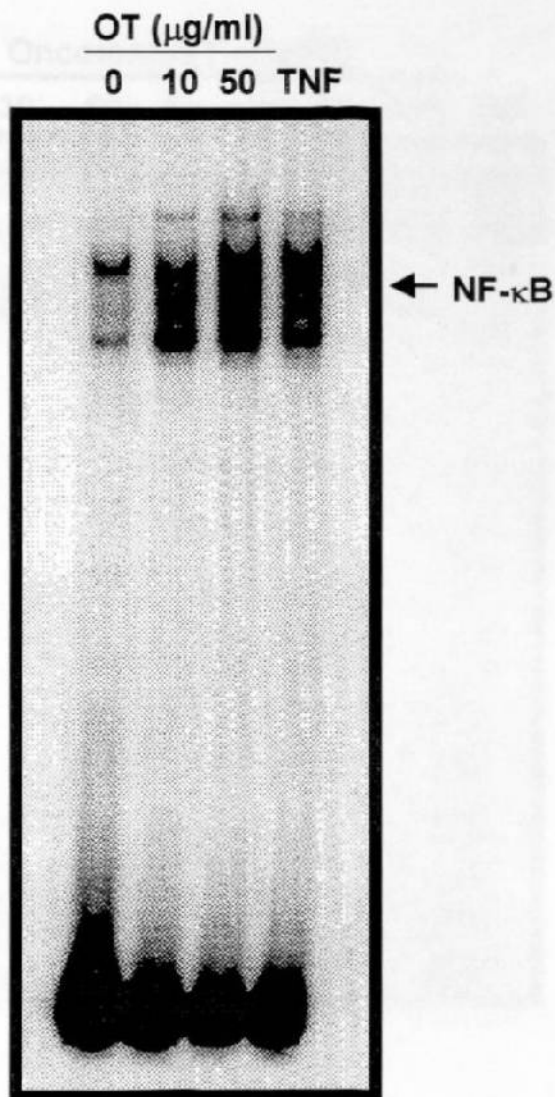
Figura 8. Mecanismo de activación del factor de transcripción NF-κB. El factor de transcripción NF-κB es un complejo de multi-proteínas que induce la síntesis de proteínas de defensa y señalamiento en células que han sido expuestas a una gran variedad de estímulos. Tres subunidades proteicas controlan las funciones biológicas del NF-κB. IκB, p50 y p65. IκB es una subunidad que inhibe la unión del NF-κB y sirve para retenerlo en una forma inducible en el citoplasma de células que no han sido estimuladas. En respuesta a una amplia variedad de estímulos IκB se va a disociar del complejo inactivo p50-p65 y una vez que ha quedado libre este complejo p50-p65 se va a translocar hacia el núcleo e induce la transcripción de genes.

Tabla VI
Agentes inductores de la activación del NF- κ B

Agente	Clase
Factor de Necrosis Tumor (TNF- α)	citocina
Linfotoxina (TNF- β)	citocina
Interleucina-1	citocina
Interleucina-2	citocina
Interferon- γ	citocina
Factor Estimulador de las Colonias de Macrófagos	citocina
Esteres de forbol	mitógeno
Lectinas	mitógeno
Anti-CD28, anti-CD3	mitógeno
Cicloheximida	inhibidor de síntesis de proteínas
Poly(rI)-poly(rC)	RNA dolbe cadena
Lipopolisacárido	producto bacterial
Citomegalovirus	virus
Virus de la Hepatitis B	virus
Virus de la Inmunodeficiencia Humana-1 (HIV-1)	virus
Virus de la leucemia de células T humana	virus
Virus Herpes simplex-1	virus
Peróxido de hidrógeno	daño oxidativo
Luz Ultravioleta	daño físico
Pervanadato	agentes químicos
Ceramida	agentes químicos

Tabla VII
NF- κ B activa una gran variedad de genes

Citocinas y Factores de Crecimiento	Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) Linfotoxina (TNF- β) Interleucina-1 β Interleucina-8 Interleucina-6 Interleucina-2 Factor Estimulador de las Colonias de Macrófagos (M-CSF) Factor Estimulador de las Colonias de Granulocitos/Macrófagos (GM-CSF) Interferón- γ
Inmunoreceptores	MHC-I MHC-II Cadenas ligeras κ de las Ig (Ig- κ -LC) β_2 -microglobulina Receptor β de células T
Factores de transcripción	Rel p105 I κ B- α Myc
Proteínas de Fase Aguda	Factor B del complemento Factor C4 del complemento Amiloide A sérico
Virus	HIV-1 Citomegalovirus Adenovirus SV-40



EMSA

Figura 9. Activación del factor de transcripción NF- κ B por la oncotoxina. Un total de 1×10^6 células del linfoma histiocítico humano (U-937) se incubaron con la oncotoxina (0, 10 y 50 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 horas a 37°C . Después del tratamiento, se prepararon extractos nucleares y se determinó la activación del NF- κ B como se describe en materiales y métodos.

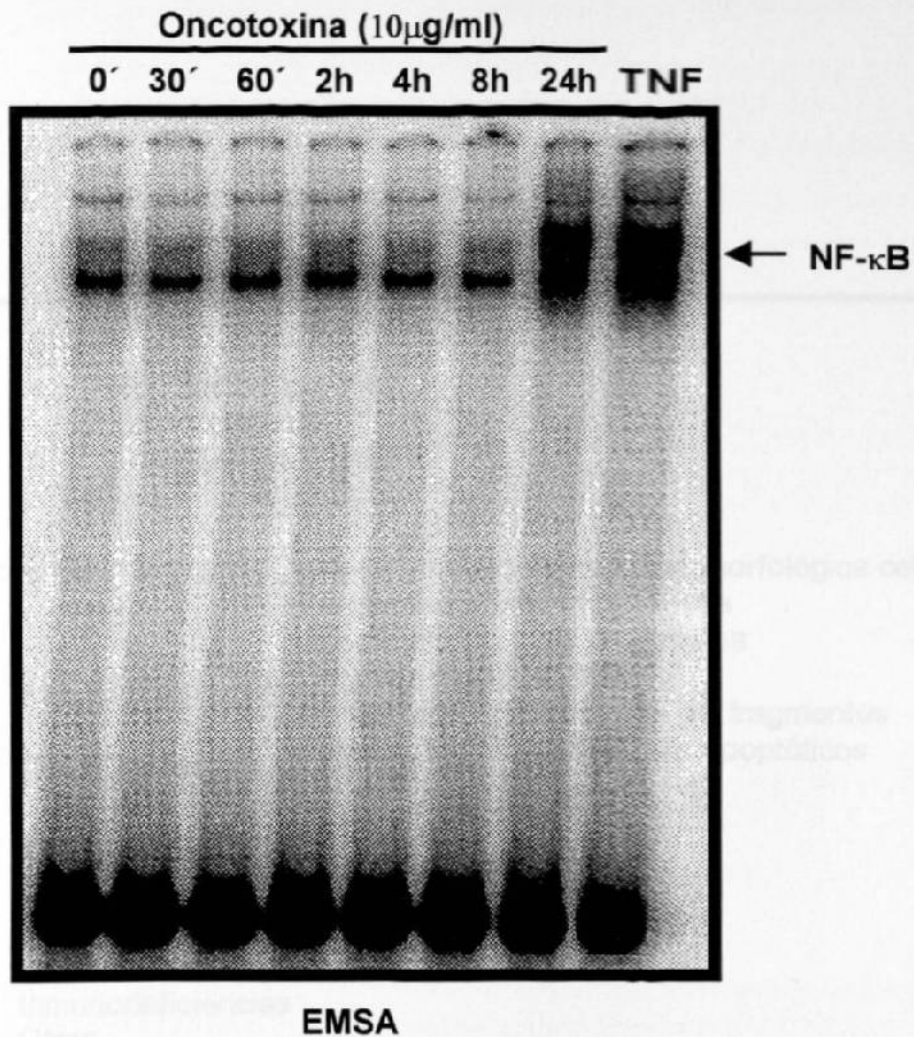


Figura 10. Cinética de activación del factor de transcripción NF- κ B por la oncotoxina. Un total de 1×10^6 células del linfoma histiocítico humano (U-937) se incubaron en presencia de la oncotoxina (10 μ g/ml) durante diferentes tiempos a 37 $^{\circ}$ C. Después del tratamiento, se prepararon extractos nucleares y se determinó la activación del NF- κ B como se describe en materiales y métodos.

Tabla VIII
Características de la Apoptosis

Importancia	Regulación Inmune Embriogenesis Homeostasis de tejidos
Características Fisiológicas	Induce una transformación morfológica celular Compactación del citoplasma Condensación de la cromatina Fragmentación del DNA Rompimiento de la célula en fragmentos Fagocitosis de los cuerpos apoptóticos
Terapia	Cáncer Enfermedades virales Degeneración neuronal Linfoproliferación Inflamación Inmunodeficiencias Otras

Tabla IX
Inductores de la Apoptosis

Agentes físicos	Luz UV Shock térmico
Agentes antineoplásicos	Actinomicina D Daunorubicina Bleomicina Vinblastina
Agentes químicos	Etanol H ₂ O ₂ Azida de sodio
Citocinas	TNF- α
Productos bacterianos	Lipopolisacáridos
Otros	Deficiencia de factores de crecimiento Deficiencia de zinc Ácido retinoico

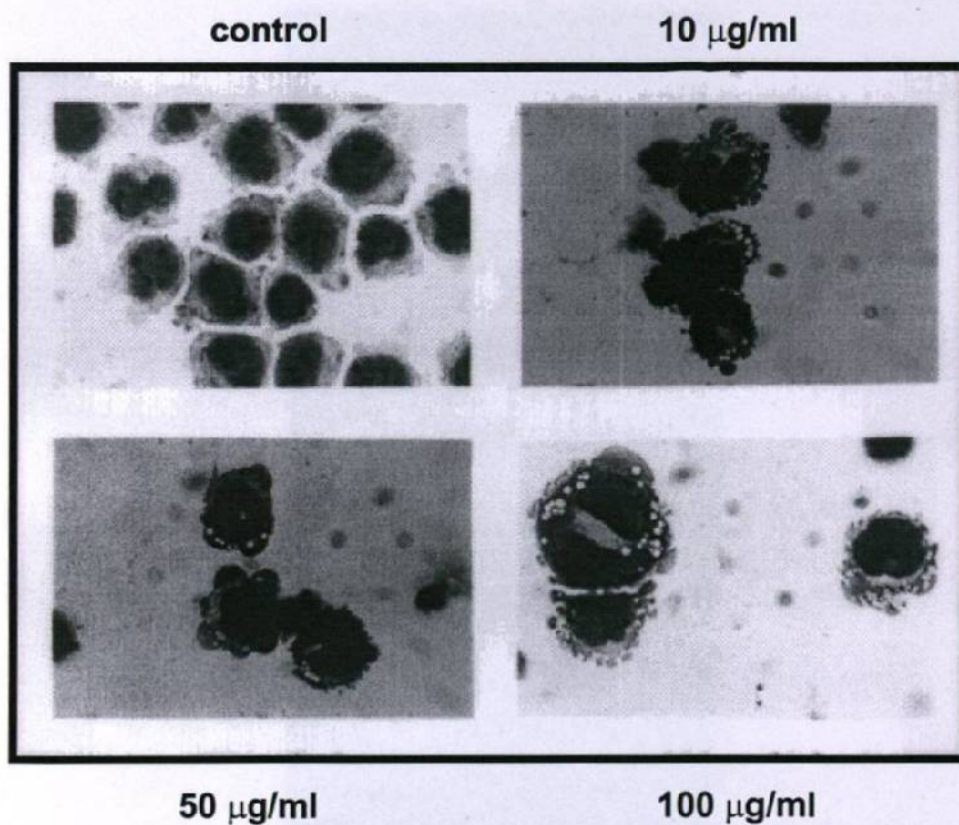


Figura 11. La oncotoxina induce apoptosis en células del linfoma histiocítico humano (U-937). Fotografía al microscopio óptico. Un total de 1×10^6 células U-937 se incubaron con la oncotoxina (0, 10, 50 y $100 \mu\text{g/ml}$) durante 72 horas a 37°C y posteriormente se tomaron fotografías al microscopio óptico observando cambios en la morfología celular.

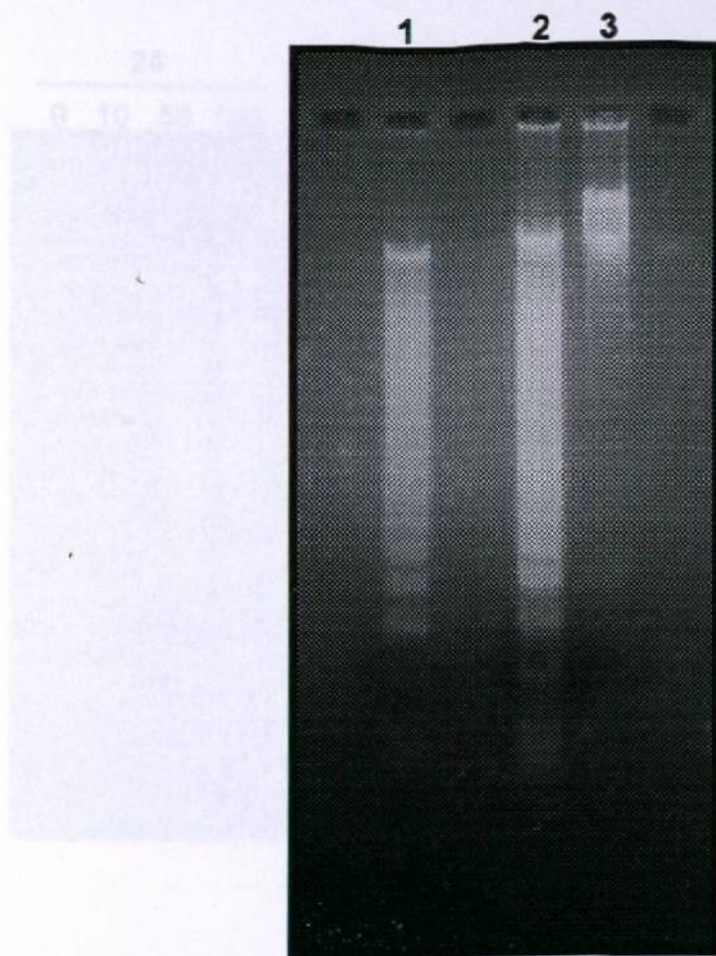


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de DNA de células U-937 tratadas con la oncotoxina.

Un total de 1×10^6 células del linfoma histiocítico humano (U-937) se incubaron con la oncotoxina ($50 \mu\text{g/ml}$) durante 24 y 72 horas a 37°C . El DNA de las células tratadas fue procesado para electroforesis como se describe en materiales y métodos. Carril 1: células U-937 + oncotoxina durante 24 horas. Carril 2: células U-937+ oncotoxina durante 72horas. Carril 3: células U-937 (control).

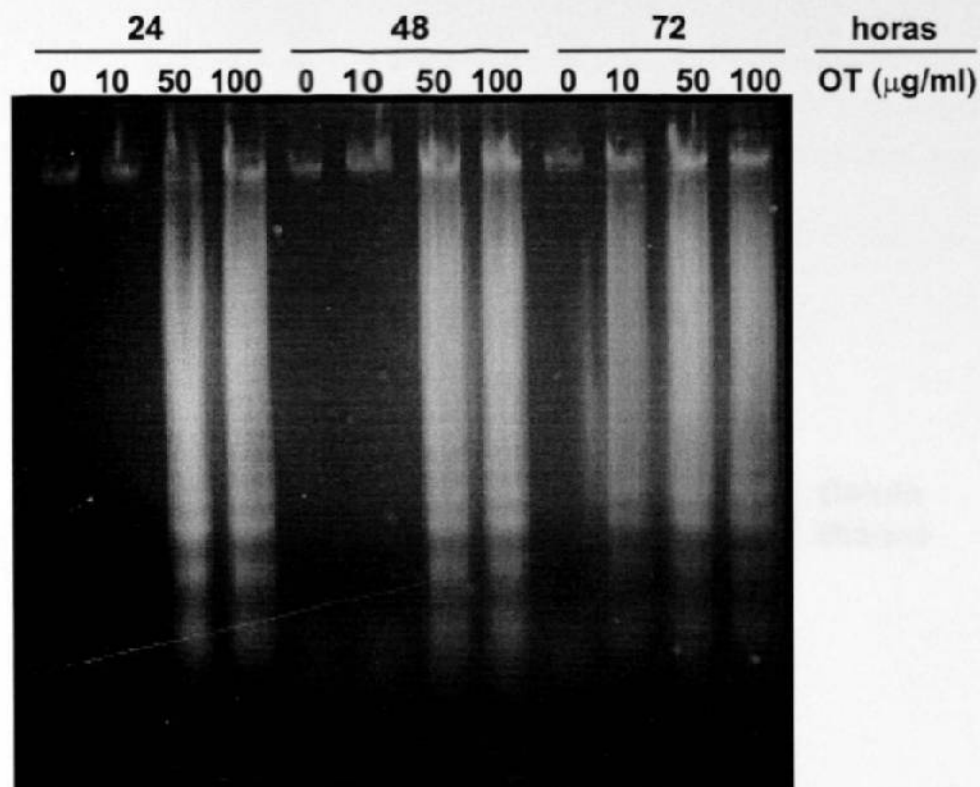


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de DNA de células U-937 tratadas con la oncotoxina. Un total de 1×10^6 células del linfoma histiocítico humano (U-937) se incubaron con la oncotoxina (0, 10, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$) durante 24, 48 y 72 horas a 37°C . El DNA de las células de cada uno de los tratamientos fue procesado para electroforesis como se describe en materiales y métodos.

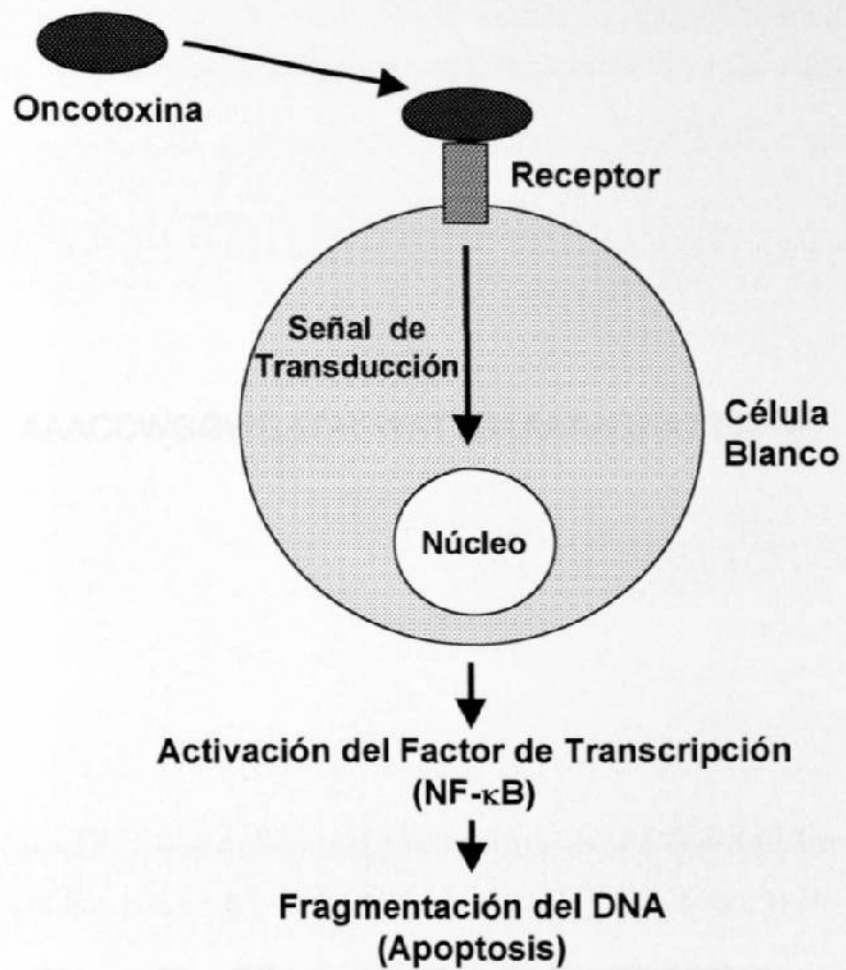


Figura 14. Mecanismo de acción de la oncotoxina.

AAACCWGGWGATACWATTGAAAAAGAATTT-³²P

Figura 15. Oligonucleótido de la oncotoxina.

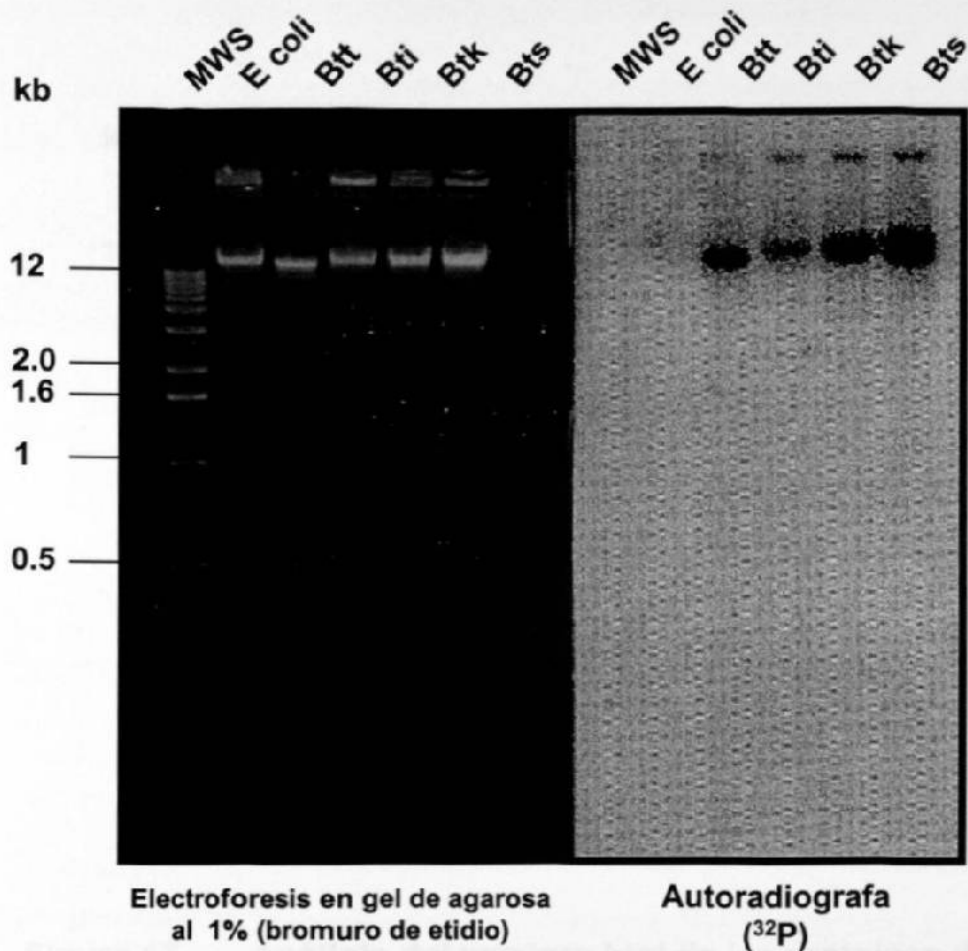


Figura 16. Southern blot hibridación del DNA de diferentes serotipos de *Bacillus thuringiensis*. La electroforesis del gel de agarosa del DNA cromosomal de diferentes serotipos de *Bt* y de *Escherichia coli* se transfirió a una membrana de Hybond+ para hibridizar con la sonda de la oncotoxina-³²P.

BIBLIOGRAFIA

1. Waing, M. M. and Ponder, B. A. J. (eds). The Search for New Anticancer Drugs. Kluwer Acad. Press, Boston, (1992).
2. Witzley, H. R. and Schnepl, H. E. The molecular biology of parasitic crystal formation. *Microbiological Rev.* 47: 1-10 (1982).
3. Witzley, H. R. and Schnepl, H. E. The molecular biology of parasitic crystal formation. *Microbiological Rev.* 47: 1-10 (1982).
4. Witzley, H. R. and Schnepl, H. E. The molecular biology of parasitic crystal formation. *Microbiological Rev.* 47: 1-10 (1982).
5. Witzley, H. R. and Schnepl, H. E. The molecular biology of parasitic crystal formation. *Microbiological Rev.* 47: 1-10 (1982).
6. Witzley, H. R. and Schnepl, H. E. The molecular biology of parasitic crystal formation. *Microbiological Rev.* 47: 1-10 (1982).
7. Witzley, H. R. and Schnepl, H. E. The molecular biology of parasitic crystal formation. *Microbiological Rev.* 47: 1-10 (1982).
8. Witzley, H. R. and Schnepl, H. E. The molecular biology of parasitic crystal formation. *Microbiological Rev.* 47: 1-10 (1982).
9. Witzley, H. R. and Schnepl, H. E. The molecular biology of parasitic crystal formation. *Microbiological Rev.* 47: 1-10 (1982).
10. Witzley, H. R. and Schnepl, H. E. The molecular biology of parasitic crystal formation. *Microbiological Rev.* 47: 1-10 (1982).

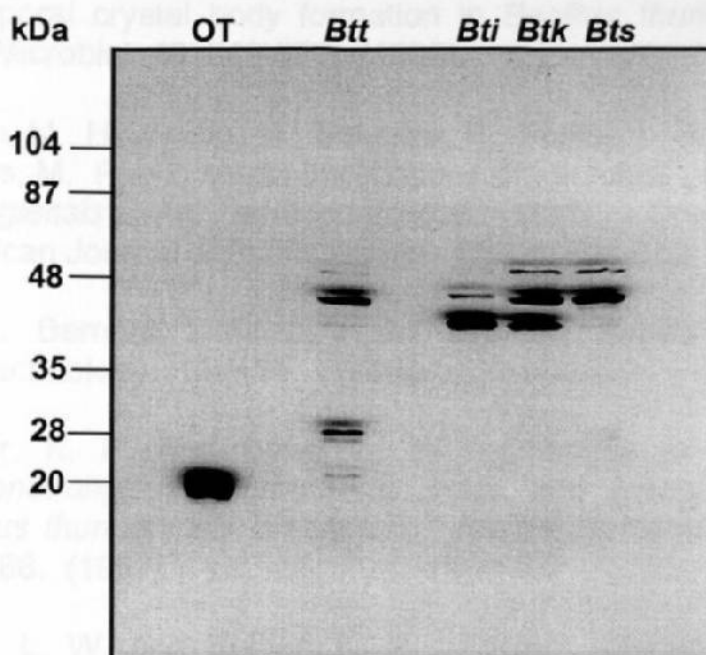


Figura 17. Análisis del western blot de las proteínas de diferentes serotipos de *Bt* utilizando anticuerpos anti-Otp. La electroforesis de las proteínas se realizó en geles de SDS-PAGE al 15%, después fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas con el anti-Otp. Posteriormente se le agregó el conjugado anti-conejo, unido a peroxidasa y revelado con el sistema de quimioluminiscencia ECL (Amersham). OT: oncotoxina purificada, *Btt*: *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *Bti*: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Btk*: *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Bts*: *Bacillus thuringiensis* var. *sotto*.

BIBLIOGRAFIA

1. Waring, M. M. and Ponder, B. A. J. (eds.). *The Search for New Anticancer Drugs*. Kluwer Acad. Press, Boston. (1992).
2. Whiteley, H. R. and Schnepf, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 549-576. (1986).
3. Green, M., Heumann, M., Sokolow, R., Foster, L. R. Bryant, R. and Skeels, M. Public health implications of microbial pesticide *Bacillus thuringiensis*: An epidemiological study, Oregon, 1985-86. *American Journal of Public Health.* 80 (7): 848-852. (1990).
4. Dixon, Bernard. Keeping an eye on *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology.* 12: 435. (1994).
5. Bottjer, K. P. And Bone, L. W. Changes in morphology of *Trichostrongylus colubriformis* eggs and juveniles caused by *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Journal of Nematology.* 19 (3): 282-286. (1987).
6. Bone, L. W. and Bottjer, K. P. Factors affecting the larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis israelensis* toxin for *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda). *Journal of Invertebrate Pathology.* 52: 102-7. (1988).
7. Meadows, J., Gill, S. S. and Bone, L. W. Factors influencing lethality of *Bacillus thuringiensis kurstaki* toxin for eggs and larvae of *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda). *Journal of Parasitology.* 75 (2): 191-194. (1989).
8. Bone, L. W. Activity of commercial *Bacillus thuringiensis* preparations against *Trichostrongylus colubriformis* and *Nippostrongylus brasiliensis*. *Journal of Invertebrate Pathology.* 53: 276-277. (1989).
9. Prasad, S. S. S. V. and Shethna, Y. I. Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 62 (3): 517-523. (1975).

10. Prasad, S. S. S. V. and Shethna, Y. I. Biochemistry and Biological activity of the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochemical Reviews*. 47: 70-76. (1976).
11. Prasad, S. S. S. V. and Shethna, Y. I. Purification, crystallization and partial characterization of the antitumor and insecticidal protein subunit from the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *Biochemica et Biophysica Acta*. 363: 558-566. (1974).
12. Prasad, S. S. S. V. and Shethna, Y. I. Biochemistry and biological activities of the proteinaceous crystals of *Bacillus thuringiensis*. *J. Scient. Ind. Res.* 35: 626-632. (1976).
13. Prasad, S. S. S. V. and Shethna, Y. I. Mode of action of a purified antitumor protein from the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* on Yoshida ascites sarcoma. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 10 (2): 293-298. (1976).
14. Zamola, B., Karminski, G., Fuks, Z., Kubovic, M. and Wrischer, M. Enhancement of intrinsic antitumor activity in spore-endotoxin mixtures of *Bacillus thuringiensis* by exposure to ultraviolet radiation. *Photochemistry Photobiology*. 41 (3): 361-365. (1985).
15. Yokoyama, Y., Ohmori, I., Kohda, K. and Kawazoe, Y. Potentiation of the cytotoxic activity of anticancer drugs against cultured L-1210 cells by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* toxin. *Chem. Pharm. Bull.* 36 (11): 4499-4504. (1988).
16. Yokoyama, Y., Ohmori, I., Kohda, K. and Kawazoe, Y. Potentiation of antitumor activity of bleomycin towards solid tumors in mice by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* toxin. *Anticancer Research*. 11: 11625-1628. (1991).
17. Yokoyama, Y. and Kohda, K. Enhanced cytotoxicity caused by increased DNA strand breakage resulting from synergistic potentiation of Bleomycin with *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* delta-endotoxin. *Anticancer Research*. 14: 838-840. (1994).
18. Gómez-Flores, R., Rodríguez-Padilla, C., Mehta, R. T., Galán-Wong, L., Mendoza-Gamboa, E. And Tamez-Guerra, R. Nitric

- oxide and TNF- α production by murine peritoneal macrophages activated with a novel 20 kDa protein isolated from *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* parasporal bodies. *Journal of Immunology*. 158 (8): 3796-3799. (1997).
19. Höfte, Herman and Whiteley, H. R. Insecticidal Crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*. 53: 242-255. (1989).
 20. Lüthy, P. And Ebersold, H. R. The entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. *Pharmac Ther Pergoman Press*. Great Britain, 13: 257-283. (1981).
 21. Hannay, C. L. and Fitz-James, P. The protein crystals of *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology*. 1: 694-710. (1955).
 22. Hannay, C. L. Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. *Nature*. 127: 1004. (1953).
 23. Angus, T. A. A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. *Nature*. 173: 345-346. (1954).
 24. Norris, J. R. The protein crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*: Biosynthesis and physical structure. In *microbial control of Insects and mites*. H. D. Burges and N. Y. Hussey, Eds. Academic Press. N. Y., 229-46. (1971).
 25. De Barjac, H. and E. Frachon. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga*. 35: 233-240. (1990).
 26. Dulmage, H. T. and Aizawa, K. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. *Microbial and viral pesticides*. Edouard Kurstak. Ed. Marcel Dekker, Inc. N. Y. and Basel. 4: 209-237. (1982).
 27. De Barjac, H. and Bonnefoi, A. A. A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* with a key their differentiation. *Journal of Invertebrate Pathology*. 11: 335-347. (1968).
 28. Heimpel, A. M. and Angus, T. A. A taxonomic key proposed for the species of the "crystalliferous bacteria". *Journal of Invertebrate Pathology*. 9: 364-375. (1966).

29. De Barjac, H. and Bonnefoi, A. Essai de classification biochimique et serologique de 24 souches de *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga*. 7 (1): 5-31. (1962).
30. Krywienczyk, J. and Angus, T. A. A serological comparison of the parasporal bodies of three insect pathogens. *Journal of Insect Pathology*. 2: 411-417. (1960).
31. Krywienczyk, J., Dulmage, H. T. and Fast, P. G. Occurrence of two serologically distinct groups within *Bacillus thuringiensis* serotype 3ab var. *kurstaki*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 31: 372-375. (1978).
32. Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feiltelson, J., Schinepf, E., Van Rie, J., Leereclus, D., Baum, J. and Dean, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbial and Molecular Biology Reviews*. 807-813. (1998).
33. Aronson, A. I., Beckman, W. and P. Dunn. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50: 1-24 (1986).
34. Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Leereclus, D., Baum, J., Feiltelson, J., Ziegler, D. R. and Dean, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62; 3: 775-806 (1998).
35. Hofman, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S. and Van Mellaert, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 7844-7848 (1988).
36. Van Rie, J., S. Jansens, Höfte, H., Degheele, D. and Van Mellaert, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Eur. J. Biochem.* 186: 239-247 (1989).
37. Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D. and H. Van Mellaert. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1378-1385 (1990).

38. Chen, X. J., Curtiss, A., Alcantara, E. and D. H. Dean. Mutations in domain I of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin cry1Ab reduce the irreversible binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 270, 6412-6419 (1995).
39. Liang, Y., Patel, S. S. and Dean, D. H. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA δ -endotoxins to gy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *J. Biol. Chem.* 270: 24719-24724 (1995).
40. Yaoi, K., Kadotani, T., Kuwana, H., Shinkawa, A., Takahashi, T., Iwahana, H. and Sato, R. Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry 1Aa toxin. *Eur. J. Biochem.* 246, 652-657 (1997).
41. Vadlamudi, R. K., Weber, E., Ji, I., T. H. and L. A. Jr. Bulla. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270, 5490-5494. (1995).
42. Denolf, P., Hendricks, K., Seuryneck, J., Vandamme, J., Jansens, S., Peferoen, M. and J. Van Rie. Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding protein. SIP 29th Annual Meeting and III International colloquium on *Bacillus thuringiensis*. Córdoba, España, 1-6 sept. Abstracts, p. 20-21. (1996).
43. Knight, P. J. K., Crickmore, N. And D. J. Ellar. The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 11, 429-436 (1994).
44. Sangadala, S., Walters, F. W., English, L. H. and M. J. Adang. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Ac toxin binding and $^{86}\text{Rb}^+$ - K^+ efflux in vitro. *J. Biol. Chem.* 269, 10088-10092 (1994).
45. Gill, S. S., Cowles, E. A. and V. Francis. Identification, isolation and cloning of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* 270, 27277-27282 (1995).

46. Valaitis, A. P., Lee, M. K., Rajamohan, F. and D. H. Dean. Brush border membrane aminopeptidase N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for the Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 25, 1143-1151 (1995).
47. Luo, K., Tabashnik, B. E. and M. J. Adang. Binding of *Bacillus thuringiensis* cry1AC toxin to aminopeptidase in susceptible and resistant diamond back moths (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1024-1027 (1997).
48. Luo, K., Lu, Y. J. and M. J. Adang. A 106 kDa form of aminopeptidase is areceptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1c δ -endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 26, 783-791 (1996).
49. Baeuerle, P. A. The inducible transcription activator NF- κ B: regulation by distinct protein subunits. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1072: 63-80 (1991).
50. Grilli, M., Jason, J., Chiu, J. S. and Lenardo, M. J. NF- κ B and rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *International Review of Cytology.* 143: 1-62 (1993).
51. Baeuerle, P. A. and Henkel, T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 141-79 (1994).
52. Siebenlist, U., Franzoso, G. and Brown, K. Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 10: 405-55 (1994).
53. Kerr, J. F. R., Willie, A. H. and Currie. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26: 239-257 (1972).
54. Wyllie, A. H. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-306 (1980).
55. Tomei, L. D. and Cope, F. O. Apoptosis: the molecular basis on cell death. *Current communications in cell and molecular biology* 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 5-29 (1991).
56. Raff, M. C. Social controls on cell survival and cell death. *Nature.* 356: 398-400 (1992).

57. White, E. Life, death and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.* (1995).
58. Fraser, A. And Evan, G. A license to kill. *Cell.* 85: 781-784 (1996).
59. Whyte, M. ICE/CED-3 proteases in apoptosis. *Cell biology.* 6: 245-248 (1996).
60. Vaux, D. L. and Strasser, A. The molecular biology of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 93 (6): 2239-44 (1996).
61. Barr, P. J. and Tomei, L. D. Apoptosis and its role in human disease. *Bio/Technology.* 12: 487-493 (1994).
62. Hickman, J. A. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev.* 11: 121-139 (1992).
63. Aggarwal, B. B., Eessalu, T. E. and Hass, P. E. Characterization of receptors for human tumor necrosis factor and their regulation by γ -interferon. *Nature.* 318: 665-667 (1985).
64. Zhang, L., Higuchi, M., total, K., Chaturvedi, M. M. and Aggarwal, B. B. Staurosporine induces the cell surface expression of both forms of human tumor necrosis factor receptors on myeloid and epithelial cells and modulates ligand-induced cellular response. *The Journal of Biological Chemistry.* 269 (14): 10270-10279 (1994).
65. Chaturvedi, M. M., LaPushin, R. and Aggarwal, B. B. Tumor Necrosis Factor and Lymphotoxin. *The Journal of Biological Chemistry.* 269: 14575-14583 (1994).
66. Higuchi, M., Singh, S. and Aggarwal, B. B. Characterization of the apoptotic effects of human tumor necrosis factor: development of highly rapid and specific bioassay for human necrosis factor and lymphotoxin using human target cells. *Journal of Immunological Methods.* 178: 173-181 (1995).
67. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingstone, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. And Struhl, K. *Current Protocols in Molecular*

Biology. Jhon Wiley and Sons, Inc. Vol. 1. Unit 2.4. Preparation of genomic DNA from bacteria. 2.4.1-2.4.5 (1987).

68. **Ausubel, F. M., Brent, R., Kingstone, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. And Struhl, K. Current Protocols in Molecular Biology. Jhon Wiley and Sons, Inc. Section IV. Unit 2.9 A. Analysis of DNA Sequences by Blotting and Hybridization. 2.9.2-2.9.15 (1987).**

