

# Activación de la proteína Cry11Bb de *Bacillus thuringiensis* subesp. *medellin* por digestión con tripsina y extractos intestinales de larvas de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)

.....

Activation of the *Bacillus thuringiensis* subesp. *medellin* Cry11Bb protein by digestion with trypsin and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larval gut extracts

.....

César Segura<sup>1</sup>  
Fanny Guzmán<sup>2</sup>  
Manuel E. Patarroyo<sup>3</sup>  
Sergio Orduz<sup>4</sup>

## Resumen

En este trabajo se investigó la capacidad de los extractos intestinales de *Culex quinquefasciatus* y de tripsina para activar la proteína tóxica Cry11Bb de *Bacillus thuringiensis* subesp. *medellin*. La actividad proteolítica de los extractos se incrementó cuando se aumentó el pH de la mezcla de reacción, siendo mayor a pH 10.6. La cinética de digestión de la proteína en el tiempo con los extractos y tripsina, mostró la formación de múltiples bandas intermediarias, las cuales terminan con la producción de dos fragmentos de 30 y 33 kDa de peso molecular relativo. La digestión de la toxina con tripsina fue comparable a la observada con los extractos intestinales, aunque la secuencia amino terminal de los fragmentos indicaron que hay ligeras diferencias en los sitios de corte. El procesamiento *in vivo* de la toxina mostró semejanzas con lo observado

*in vitro*; sin embargo, se observaron 3 bandas. Los resultados preliminares de toxicidad indican que los fragmentos de la proteína Cry11Bb son tóxicos contra larvas de mosquitos. Estos datos muestran un posible papel de las proteasas intestinales de *C. quinquefasciatus* en la activación de la proteína Cry11Bb de *B. thuringiensis* subesp. *medellin*.

**Palabras claves:** *Bacillus thuringiensis*, Toxina Cry11Bb, Activación, Proteasas intestinales, *Culex quinquefasciatus*.

## Summary

The ability of the larval midgut protease extracts from *Culex quinquefasciatus* and trypsin to process *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* Cry11Bb toxin was investigated. The activity of midgut proteases increase with an increment in pH being the highest activity obtained at pH 10.6. A time course study showed partial fragmentation of the protein ultimately ending in the production of protease-resistant core fragments of relative molecular masses of 30 and 33 kDa. Proteases with trypsin specificity were detected in *C. quinquefasciatus* larval midgut extracts. This activity was detected by N-terminal amino acid sequence analysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* Cry11Bb toxin proteolytic fragments. *In vivo*, the mosquito larvae processed the inclusions generating three fragments. The fragments fully retain their toxicity to *C. quinquefasciatus* first instar larvae. These data indicate the possible role of midgut proteases in *B. thuringiensis* subsp. *medellin* Cry11Bb toxin activation.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, Cry11Bb toxin, Activation, Gut proteases, *Culex quinquefasciatus*.

## Introducción

*Bacillus thuringiensis* sintetiza y empaqueta proteínas denominadas  $\delta$ -endotoxinas en una inclusión cristalina durante el estado de esporulación que son tóxicas contra diferentes órdenes de insectos (Navon 1993; Becker y Margalit 1993; Keller y Langenbruch 1993). Después de la ingestión por parte del insecto susceptible, el cristal es solubilizado bajo las condiciones reductoras y alcalinas del intestino medio y procesada a fragmentos más pequeños mediante la participación de las proteasas intestinales (Tojo y Aizawa 1983; Rajamohan *et al.* 1998; Dai y Gill 1993). Los polipéptidos resultantes reconocen receptores específicos sobre la superficie intestinal, los cuales catalizan la inserción de la toxina en la membrana celular llevando a la formación de canales iónicos y a la muerte del insecto por desbalance osmótico (Rajamohan *et al.* 1998).

La incubación de las toxinas Cry4Aa y Cry4Ba de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* con extractos intestinales resulta en la formación de fragmentos de aproximadamente 46-48 kDa (Angsuthanasombat *et al.* 1992). De la misma manera, la toxina Cry11Aa de la misma especie, es procesada *in vitro* e *in vivo* a fragmentos de 30-40 kDa por proteasas del mosquito *Culex quinquefasciatus* (Dai y Gill 1993). Esto indica que el procesamiento es un paso necesario en la activación de estas toxinas bacterianas (Rajamohan *et al.* 1998).

*Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* fue señalada por Orduz *et al.* en 1992. Las proteínas que componen su inclusión cristalina han sido denominadas Cry11Bb (Orduz *et al.* 1998), Cyt1Ab1 (Thiéry *et al.* 1997), y una proteína de 68 kDa (Orduz *et al.* 1994). La proteína Cry11Bb muestra actividad tóxica frente a diferentes especies de larvas de mosquitos y su toxicidad es mayor que la toxicidad producida por la proteína Cry11Aa de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Restrepo *et al.* 1997; Orduz *et al.* 1998). En este trabajo estudiamos la activación proteolítica de la toxina Cry11Bb de *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* por extractos intestinales de larvas de *C. quinquefasciatus* y tripsina; se comprobó el efecto del pH sobre la proteólisis de la toxina, así como su cinética; se identificaron los sitios de corte mediante la secuencia amino terminal de los fragmentos generados y se determinó la toxicidad de la forma activada comparada con la toxina cristalina.

## Materiales y Métodos

**Toxina, anticuerpos y mosquitos.** La toxina Cry11Bb de *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* se obtuvo de una bacteria recombinante *B. thuringiensis* cepa 4Q2-81 transformada con el plásmido pBTM3 que contiene un fragmento de ADN de 4.4 kb que codifica

1 Biólogo. Investigador de la Unidad de Biotecnología y Control Biológico. Corporación para Investigaciones Biológicas. A. A. 7378. Medellín, Colombia.

2 Química. Jefe de la Sección de Química. Instituto de Inmunología. Hospital San Juan de Dios. Universidad Nacional de Colombia. Av. 1<sup>o</sup>, Carrera 10<sup>a</sup>. Santaafé de Bogotá, Colombia.

3 Médico. Director del Instituto de Inmunología. Hospital San Juan de Dios. Universidad Nacional de Colombia. Av. 1<sup>o</sup>, Carrera 10<sup>a</sup>. Santaafé de Bogotá, Colombia.

4 Biólogo Ph.D. Jefe de la Unidad de Biotecnología y Control Biológico. Corporación para Investigaciones Biológicas. A. A. 7378. Medellín, Colombia.

para la proteína (Restrepo *et al.* 1997). Los mosquitos de la especie *C. quinquefasciatus* fueron mantenidos bajo condiciones de laboratorio a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  con un fotoperíodo luz-oscuridad de 12:12 h. Los anticuerpos anti-Cry11Bb fueron producidos en ratón (Orduz *et al.* 1996).

**Preparación y solubilización de la toxina de 94 kDa.** La toxina fue aislada de las bacterias esporuladas de acuerdo con el método de Otieno-Ayayo *et al.* (1993): un cultivo completo final (250 ml) se lavó dos veces con agua destilada, el botón resultante se resuspendió en NaCl 50 mM por 1 h a  $30^\circ\text{C}$  y se lavó dos veces con agua destilada. El botón se resuspendió en agua y se adicionó a una mezcla de volúmenes iguales de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  al 1% y  $\text{CCl}_4$ . La mezcla se agitó vigorosamente por 10 min en un embudo de decantación y reposó por 1 h hasta la formación de dos fases. La fase superior con los cristales se lavó dos veces con agua destilada y se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$ . Los cristales se solubilizaron en una solución tampón Caps 100 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol al 0.05%, pH 10.6 por 1 h a  $30^\circ\text{C}$ , el material insoluble se removió por centrifugación a 12.000 rpm por 10 min (Choma *et al.* 1990). La concentración de la proteína soluble se determinó por el método de Bradford usando albúmina bovina sérica (ABS) como estándar.

**Preparación de las proteasas intestinales.** Las proteasas intestinales se prepararon a partir de larvas de tercer instar de *C. quinquefasciatus* de acuerdo con Garczynski *et al.* (1991). Larvas de cuarto instar se lavaron con agua destilada y se pusieron en hielo durante 15 min. Los intestinos se disecaron, se colocaron en tampón de maceración, (mannitol 0.3 M, tris-HCl 0.1 M, pH 7.2) y se almacenaron a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su uso. El tejido se maceró mecánicamente en el mismo tampón suplementado con fenil-metil-sulfonil-fluoruro 0.1 M (PMSF). El macerado se clarificó a 12.000 rpm por 30 min, la suspensión se pasó a través de un filtro de  $0.2 \mu\text{m}$  y se almacenó a  $-70^\circ\text{C}$ . La concentración de proteína soluble se determinó como ya se mencionó.

**Activación in vitro.** La actividad proteolítica de los extractos intestinales se realizó empleando la toxina como sustrato de acuerdo con Choma *et al.* (1990). Se incubaron 100  $\mu\text{g}$  de la toxina en dos relaciones toxina: proteasas (peso:peso) de 100:1 y 5:1, en presencia de  $\text{CaCl}_2$  1 mM a  $25^\circ\text{C}$ . La reacción se detuvo a diferentes tiempos (1.2, 5, 10, 30, 60, 120 min y 20 h) mediante la adición de 10  $\mu\text{l}$  de buffer de carga suplementado con PMSF 10 mM y ácido etil-endiamino tetra-acético (EDTA) 20 mM. Los productos de la proteólisis se analizaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE). Los fragmentos se visualizaron mediante tinción con azul de

Coomasie y el peso molecular se determinó mediante el análisis de los geles con el programa NIH image (versión 1.56). El mismo procedimiento se aplicó para analizar el efecto del pH en la activación, los pHs fueron: pH 7.1 y 7.7 en  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM; pH 8.0 y 8.8 en Tris-HCl 50 mM; pH 9.0, 9.5 y 9.9 en  $\text{NaHCO}_3$ - $\text{Na}_2\text{CO}_3$  50 mM y pH 10.6 en Caps 100 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol al 0.05%.

**Secuencia N-terminal de los fragmentos de 30 y 33 kDa.** La toxina Cry11Bb se trató como se describió en activación *in vitro* y los fragmentos se prepararon para la secuencia N-terminal de acuerdo con las técnicas de Reim y Speicher (1997). Las bandas individuales se cortaron y se aplicaron a la columna de un secuenciador automático Applied Biosystems modelo 477A. El análisis de los derivados aminoácido-feniltiohidantoina se hizo con un sistema HPLC Applied Biosystems modelo 120A conectado al secuenciador.

**Activación in vivo.** Se realizó de acuerdo con Dai y Gill (1993): cinco larvas de cuarto instar de *C. quinquefasciatus* se suspendieron en 1 ml de agua destilada que contenía 10  $\mu\text{g}$  del cristal de la toxina Cry11Bb por espacio de 1 h, entonces se lavaron con 100 ml de agua destilada a través de un cedazo de  $0.75 \mu\text{m}$ , el intestino fue extraído y resuspendido en buffer de carga a  $95^\circ\text{C}$ . Los fragmentos se separaron por SDS-PAGE y transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de acuerdo con Reim y Speicher (1997). La membrana fue evaluada con un anticuerpo policlonal anti-Cry11Bb. Se empleó un anticuerpo secundario anti-ratón IgG producido en cobayo acoplado a fosfatasa alcalina y como sustrato cromogénico se empleó cloruro de nitrotetrazolium azul (1 mg/ml) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (1.5 mg/ml en dimetilformamida).

**Bioensayos.** La toxicidad de los fragmentos proteolíticos de la toxina Cry11Bb se determinó por medio de bioensayos en larvas de primer instar de mosquitos (Orduz *et al.* 1996). La toxina solubilizada (100  $\mu\text{g}$ ) se incubó con las proteasas intestinales y tripsina (10  $\mu\text{g}$ ) en Caps 100 mM;  $\beta$ -mercaptoetanol al 0.05% de pH 10.6 por 16 h a  $25^\circ\text{C}$ . El digerido se adicionó a 1 ml de agua destilada que contenía 5 larvas de primer instar de *C. quinquefasciatus*. La mortalidad fue leída a las 24 h y la concentración letal media  $\text{LC}_{50}$  se estimó mediante el análisis probit (Raymond 1985).

## Resultados

**Efecto del pH sobre la activación de la toxina Cry11Bb.** La tripsina y las proteasas intestinales digirieron la toxina Cry11Bb en fragmentos principales de 30 y 33 kDa en los pHs entre 7.0 y 10.6 (Fig. 1). La activación de la inclusión cristalina fue parcial a los pHs neutro y alcalino, sin embargo, fue completa al pH

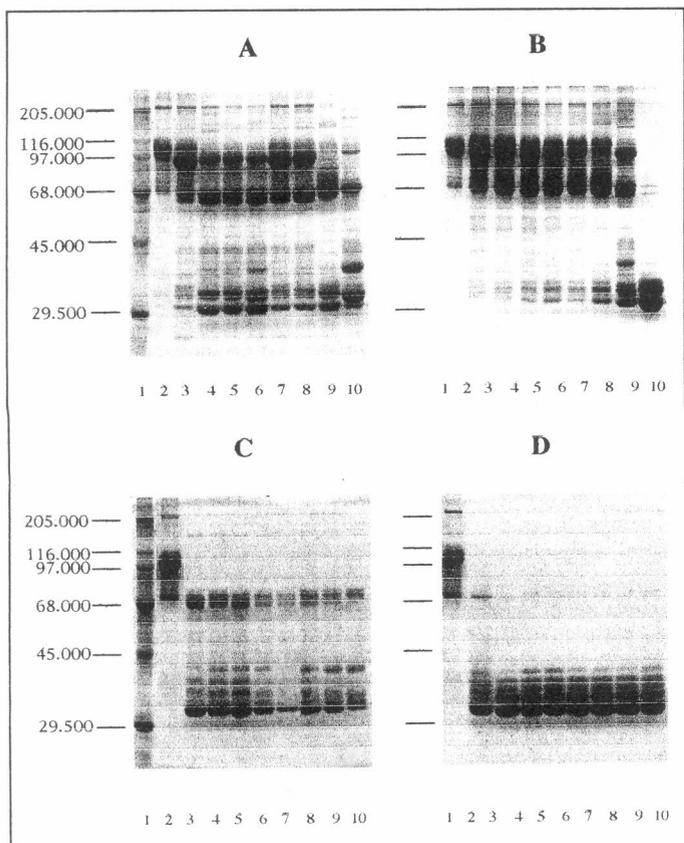
de 10.6. El cristal muestra la formación de fragmentos de masas moleculares intermedias entre 97 y 68 kDa y la dupla de 30 y 33 kDa (Fig. 1A y 1B). En contraste, la activación de la toxina soluble mostró la formación de diferentes polipéptidos de peso molecular entre 45 y 30 kDa (Fig. 1C y 1D). Adicionalmente, la tripsina clivó la toxina soluble en al menos cuatro polipéptidos de aproximadamente 70-68 kDa (Fig. 1C). Este estudio mostró la formación de intermediarios entre la proteína Cry11Bb y los fragmentos de 30 y 33 kDa (Fig. 1A y 1B).

**Activación in vitro de la toxina Cry11Bb.** El estudio de la activación a los diferentes tiempos de incubación evidenció que la formación de los fragmentos de 30 y 33 kDa ocurre rápidamente (Fig. 2); además, ésta fue dependiente de la proporción toxina: proteasa. Los fragmentos proteolíticos de 30 y 33 kDa aparecieron después de 10 min en la proporción toxina: proteasa de 5:1 y a los 30 min en la proporción de 100:1 (Fig. 2A y 2B). Para determinar el tipo de actividad proteolítica presente en los extractos, se estudió la proteólisis de la toxina con tripsina. Esta generó fragmentos básicamente iguales a los generados por las proteasas intestinales (Fig. 1A y 1C).

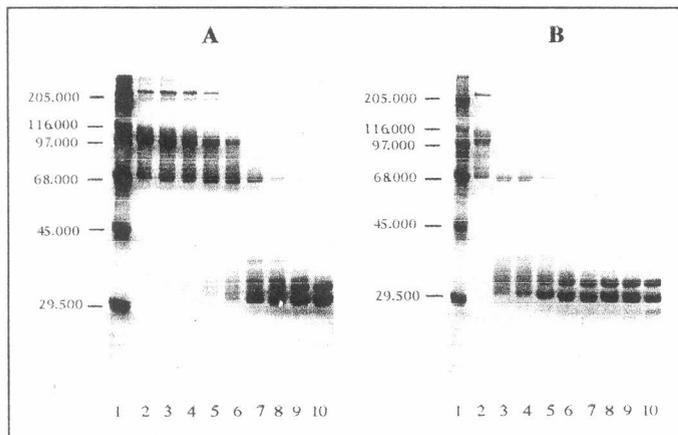
**Secuencia N-terminal de 30 y 33 kDa.** Veinte residuos desde el extremo N-terminal se leyeron de cada fragmento, las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia completa de la toxina Cry11Bb (Orduz *et al.* 1998). La secuencia del fragmento de 33 kDa generado por las proteasas intestinales y la tripsina fue estimada como NTRNEILHTVPIHHPD, mientras que la secuencia del fragmento de 30 kDa se determinó como IAPALIAVAPIAKYLATALA cuando fue procesada por las proteasas intestinales e IEPSIAPALIAVAPIAKYLA cuando fue procesada con tripsina. Un corrimiento de 4 aminoácidos se observó en la secuencia de este fragmento (Tabla 1).

**Activación in vivo de la inclusión de la proteína Cry11Bb.** Después de 30 min de ingerida la toxina por las larvas de tercer instar de *C. quinquefasciatus* se observó la presencia de fragmentos de 27, 30 y 33 kDa (Fig. 3A). De la misma manera, un experimento paralelo *in vitro* mostró la formación de los mismos fragmentos. El fragmento de 27 kDa fue revelado cuando los productos de activación fueron analizados por medio de la técnica de western blot. Se observó mortalidad en las larvas expuestas a la toxina y en algunos casos una pérdida de vitalidad en las larvas. No se detectó actividad proteolítica posterior a 1 h de incubación (Fig. 3B).

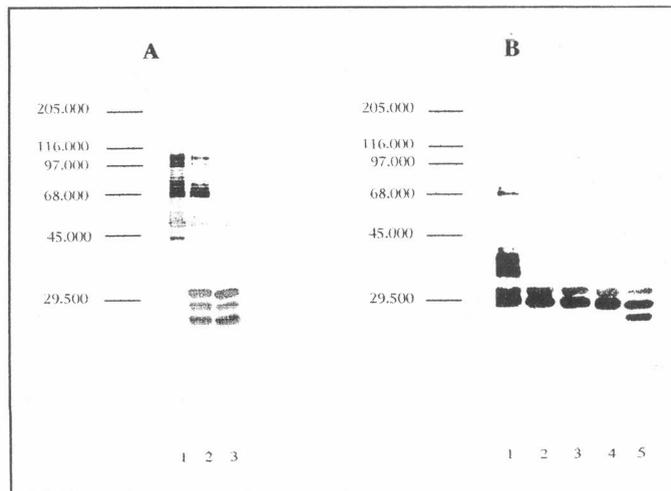
**Toxicidad de la toxina Cry11Bb activada.** La toxicidad de la toxina activada se comparó con la toxicidad de la inclusión y la toxina soluble. El valor del  $\text{LC}_{50}$  de la inclusión



**Figura 1.** Efecto del pH sobre la activación de la toxina Cry11Bb de *Bacillus thuringiensis* subesp. *medellin*. **A**, cristales activados con tripsina; **B**, cristales activados con proteasas intestinales de *Culex quinquefasciatus*; **C**, toxina soluble activada con tripsina y **D**, toxina soluble activada con proteasas intestinales de *Culex quinquefasciatus*. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, toxina Cry11Bb; carril 3, pH 7.1; carril 4, pH 7.7; carril 5, pH 8.0; carril 6, pH 8.8; carril 7, pH 9.0; carril 8, pH 9.5; carril 9, pH 9.9 y carril 10, pH 10.6.



**Figura 2.** Activación in vitro de la toxina Cry11Bb de *Bacillus thuringiensis* subesp. *medellin* por las proteasas intestinales de *C. quinquefasciatus* a diferentes intervalos de tiempo. Panel **A**, proporción toxina: proteasa de 100:1; panel **B**, proporción toxina: proteasa de 5:1. Carril 1, marcadores de peso molecular; carril 2, Toxina Cry11Bb; carril 3, 1 min; carril 4, 2 min; carril 5, 5 min; carril 6, 10 min; carril 7, 30 min; carril 8, 60 min; carril 9, 120 min; carril 10, 20 h.



**Figura 3.** Activación in vivo de la toxina Cry11Bb de *Bacillus thuringiensis* subesp. *medellin* por larvas de tercer instar de *Culex quinquefasciatus*. **A**, activación in vivo; **B**, activación in vitro. Carril 1, 10 min; carril 2, 30 min; carril 3, 60 min; carril 4, 120 min y carril 5, 20 h.

**Tabla 1.** Secuencia N-terminal de los fragmentos generados por la activación de la toxina Cry11Bb de *Bacillus thuringiensis* subesp. *medellin* por tripsina y extractos intestinales de *Culex quinquefasciatus*.

Fragmentos	Secuencia N-terminal	Sitio de corte	Tipo de proteasa
33 kDa	<sup>396</sup> NTRNEILTHTVPITHHPPD <sup>414</sup>	A <sup>395</sup> -N <sup>396</sup>	Tripsina
30 kDa	<sup>56</sup> IEPSIAPALIAVAPIAKYLA <sup>75</sup>	K <sup>55</sup> -I <sup>56</sup>	Tripsina
Extracto intestinal <i>Culex quinquefasciatus</i>			
33 kDa	<sup>396</sup> NTRNEILTHTVPITHHPPD <sup>414</sup>	A <sup>395</sup> -N <sup>396</sup>	Tripsina
30 kDa	<sup>60</sup> IAPALIAVAPIAKYLATALA <sup>79</sup>	S <sup>59</sup> -I <sup>60</sup>	ND

Los números indican la posición de los aminoácidos en la secuencia completa de la proteína (Orduz *et al.* 1998). Las secuencias están indicadas en código de una sola letra.

ND, No determinado.

**Tabla 2.** Toxicidad de la proteína Cry11Bb activada con tripsina y extractos intestinales de *Culex quinquefasciatus* frente al cristal y la toxina soluble

Proteína	LC <sub>50</sub> (ng/ml)
Toxina Cry11Bb (inclusión cristalina)	22.12 (16.77-29.76)*
Toxina Cry11Bb (solubilizada)	114.47 (59.59-295.87)
<b>Toxina Cry11Bb activada con:</b>	
Extractos intestinales de <i>Culex quinquefasciatus</i>	38.25 (29.04-50.34)
Tripsina	28.27 (19.45-41.67)

\* Intervalos de confianza del 95%.

parasporal de la toxina Cry11Bb hacia larvas de primer ínstar fue calculado en 22.12 ng/ml. Mientras que el  $LC_{50}$  de la toxina soluble fue 114.47 ng/ml como consecuencia de la solubilización; esto indica una reducción en un factor de cinco en la potencia de la toxina. Sin embargo, cuando la toxina fue activada con los extractos intestinales de *C. quinquefasciatus* y tripsina, mostró un  $LC_{50}$  de 38.25 ng/ml y de 28.27 ng/ml respectivamente, valores éstos, que son próximos a los valores de toxicidad reportados para la inclusión en la tabla 2.

## Discusión

La solubilización y modificaciones bioquímicas posteriores que sufren las proteínas tóxicas de *B. thuringiensis* desde una forma inactiva hasta una forma activa, son pasos obligados en el proceso que conduce a la toxicidad hacia larvas de insectos (Andrews *et al.* 1985; Nicolás *et al.* 1990; Aronson *et al.* 1991; Dai y Gill 1993). En este estudio se observó que la toxina Cry11Bb fue rápidamente procesada *in vitro* e *in vivo* a fragmentos de 30 and 33 kDa por la tripsina y los extractos intestinales.

Se encontró que la mayor proteólisis de la toxina Cry11Bb de *B. thuringiensis* subesp. *medellin* se llevó a cabo a los valores de pH alcalinos, indicando que la solubilización es importante en el procesamiento de la toxina, lo cual está de acuerdo con las condiciones fisicoquímicas del intestino medio de las larvas que se han descrito en la literatura (Dadd 1975; Berenbaum 1980).

El análisis de la tasa de procesamiento *in vitro* de la toxina Cry11Bb mostró que ésta transcurre rápido y a través de la formación de intermediarios entre la protoxina (Cry11Bb) y los fragmentos de 30 y 33 kDa (Fig. 1A, 1B, 1C y 1D), finalizando con la formación de dos bandas principales de 30 y 33 kDa (Fig. 2A y 2B). La activación de la toxina Cry11Bb muestra similitudes con la activación de la toxina Cry11Aa de *B. thuringiensis* (Dai y Gill 1993) y con el procesamiento de otras toxinas activas para los órdenes lepidóptera y coleóptera (Carroll *et al.* 1989; Andrews *et al.* 1985) como son: la formación de fragmentos menores que 40 kDa; un procesamiento secuencial a través de la formación de intermediarios, la ubicación de los sitios de corte situados al comienzo y en el centro de la proteína y un procesamiento de los extremos N- y C-terminal.

A diferencia de las toxinas de la familia Cry1 presentes en varias cepas de *B. thuringiensis* que cuando son procesadas pierden un fragmento estructural resultando en la liberación de un polipéptido entre 60-70 kDa que corresponde al fragmento activo o toxina (Hodgman y Ellar 1990; Angsuthanasombat *et al.* 1992) el procesamiento de la toxina Cry11Aa de *B.*

*thuringiensis* subesp. *israelensis* produce fragmentos de peso molecular entre 30 y 40 kDa (Dai y Gill 1993) lo cual sugiere una organización diferente en términos de estructura-función.

La proteína Cry11Bb tiene una identidad del 60.9% con Cry11Aa de *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* y del 83% con la proteína Cry11Ba de *Bacillus thuringiensis* subesp. *jegathesan*; además comparten el mismo espectro de actividad tóxica específica contra mosquitos (Orduz *et al.* 1998 y Restrepo *et al.* 1997). Los resultados de procesamiento de la toxina Cry11Bb en fragmentos de 30 y 33 kDa muestran similitud con el procesamiento observado en la toxina Cry11Aa, lo cual es un argumento más a favor de su inclusión en ese grupo.

El procesamiento *in vivo* de la toxina es comparable al procesamiento *in vitro*, sin embargo, se observó un fragmento de 27 kDa adicional a los de 30-33 kDa. Varias hipótesis pueden explicar este resultado: (i) la participación de otras proteasas diferentes, a la tripsina en el intestino de la larva; (ii) la mayor eficiencia del procesamiento *in vivo*; (iii) la sensibilidad del anticuerpo empleado en la identificación de los fragmentos. La estructura primaria de la toxina Cry11Bb (Orduz *et al.* 1998) reveló sitios potenciales de corte para tripsina, quimotripsina, amilasa, proteinasa K, entre otros. En particular, actividad proteolítica de tripsina fue identificada en los extractos intestinales; de la misma manera, resultados no mostrados indican también que la quimotripsina procesa la proteína de manera similar a la tripsina. La presencia de tripsina y quimotripsina en el intestino de las larvas ya ha sido indicada (Yang y Davis 1971).

Los sitios de corte se ubicaron entre los aminoácidos Ser<sup>55</sup>-Ile<sup>56</sup> y Ala<sup>395</sup>-Asn<sup>396</sup>, indicando que los extremos N- y C-terminal no tienen ninguna actividad mosquitocida. La predicción de la estructura secundaria de la proteína muestra que los sitios identificados se ubican en regiones que corresponden a vueltas reversas y que podrían estar en sitios expuestos de la proteína. La diferencia de 4 aminoácidos en el sitio de corte del fragmento de 30 kDa procesados con tripsina y extractos intestinales de *C. quinquefasciatus* (Tabla 1), indica que la región N-terminal de la proteína puede ser más susceptible al ataque de las proteasas. De la misma manera, y teniendo en cuenta la ubicación de los sitios de corte y la movilidad relativa de los fragmentos en SDS-PAGE, se puede deducir que en la activación de la proteína Cry11Bb tiene lugar un procesamiento N- y C-terminal que lleva a la pérdida de cinco secuencias repetitivas de 16 aminoácidos de la porción C-terminal.

Los bioensayos mostraron que la solubilización y la activación proteolítica de la toxi-

na afectan la toxicidad. Los cálculos de la toxicidad muestran una reducción en un factor de cinco cuando la toxina es solubilizada comparada con la toxicidad de la inclusión cristalina. Esta reducción en la potencia de la toxina puede ser debida a que el aparato bucal de las larvas de mosquitos está especializado en la ingestión de material particulado (Dadd 1975). Cuando la toxina se activó con tripsina y/o extractos intestinales de *C. quinquefasciatus* se produjo un aumento en la toxicidad en un factor de 5 comparable al factor perdido en la solubilización, así la activación restauró la actividad tóxica de la toxina; esta observación sugiere también que la activación proteolítica es un evento importante en la toxicidad de la proteína. La activación de la toxina Cry11Bb sugiere un modo de acción complejo en el cual los fragmentos N y C-terminal son indispensables para la toxicidad como ya ha sido indicado para otras toxinas como la Cry11Aa (Dai y Gill 1993).

## Conclusiones

En este trabajo se estudió la proteólisis de la toxina Cry11Bb. Se describe el procesamiento *in vitro* e *in vivo* de la toxina Cry11Bb y se concluye:

- La toxina Cry11Bb es realmente procesada *in vitro* por las proteasas intestinales larvales de la especie *C. quinquefasciatus* a fragmentos de 30-33 kDa.
- Proteasas con especificidad de tripsina se detectaron en los intestinos de las larvas de *C. quinquefasciatus* como fue determinado mediante análisis de secuencia N-terminal.
- Los fragmentos proteolíticos mostraron actividad tóxica frente a larvas de mosquitos, lo que sugiere que las proteasas intestinales tienen un papel en la activación de la toxina Cry11Bb.

## Agradecimientos

Los autores de este trabajo agradecen la excelente asistencia técnica de Elizabeth Escobar. Este trabajo fue financiado por Colciencias y la Corporación para Investigaciones Biológicas.

## Bibliografía

- ANDREWS, R.E.; BIBILOS, M.M.; BULLA, L.A. 1985. Protease activation of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*. Applied and Environmental Microbiology (Estados Unidos) 50: 737-742.
- ANGSUTHANASOMBAT, C.; CRICKMORE, N.; ELLAR, D. 1992. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry1VA and Cry1VB cloned toxins reveals synergism *in vivo*. FEMS Microbiology Letters (Irlanda) 94: 63-68.

- ARONSON, A.I.; HAN, E.-S.; McGAUGHEY, W.; JOHNSON, D. 1991. The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Applied and Environmental Microbiology* (Estados Unidos) 57: 981-986.
- BECKER, N.; MARGALIT, J. 1993. Use of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* against mosquitoes and blackflies. In *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: Theory and Practice. Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J.; Higgs, S. editors. p. 147 (Inglaterra).
- BERENBAUM, M. 1980. Adaptive significance of midgut pH in larval Lepidoptera. *American Naturalist* (Estados Unidos) 115: 138-146.
- CARROLL, J.; LI, J.; ELLAR, D.J. 1989. Proteolytic processing of a coleopteran-specific  $\delta$ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Biochemical Journal* (Inglaterra) 261: 99-105.
- CHOMA, T.C.; SURWICZ, W.K.; CAREY, P.R.; POZSGAY, M.; RAYNOR, T.; KAPLAN, H. 1990. Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis*. *European Journal of Biochemistry* (Inglaterra) 189: 523-527.
- DADD, R.H. 1975. Alkalinity within the midgut of mosquito larvae with alkaline active enzymes. *Journal of Insect Physiology* (Inglaterra) 21: 1847-1853.
- DAI, S.M.; GILL, S. 1993. *In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (Inglaterra) 23: 273-283.
- GARCZYNSKI, S.F.; CRIM, J.W.; ADANG, M.J. 1991. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin by protein blot analysis. *Applied and Environmental Microbiology* (Estados Unidos) 57: 2816-2820.
- HODGMAN, T.C.; ELLAR, D.J. 1990. Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins determined by computational analysis. *DNA sequence Journal* (Inglaterra) 1: 97-106.
- KELLER, B.; LANGENBRUCH, G.-A. 1993. Control of Coleopteran pest by *Bacillus thuringiensis*. In *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: Theory and Practice. Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J.; Higgs, S. editors. p. 171. (Inglaterra).
- NAVON, A. 1993. Control of lepidopteran pest with *Bacillus thuringiensis*. In *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: Theory and Practice. Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J.; Higgs, S. editors. p. 125. (Inglaterra).
- NICOLAS, L.; LECROISEY, A.; CHARLES, J.-F. 1990. Role of the gut proteinases from mosquito larvae in the mechanism of action and the specificity of the *Bacillus sphaericus* toxin. *Canadian Journal of Microbiology* (Canada) 36: 804-807.
- ORDUZ, S.; ROJAS, W.; CORREA, M.M.; MONTROYA, A.E.; DE BARJAC, H. 1992. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* (Estados Unidos) 59: 99-103.
- ORDUZ, S.; DIAZ, T.; THIERY, I.; CHARLES, J.-F.; ROJAS, W. 1994. Crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* serovar. *medellin*. *Applied Microbiology and Biotechnology* (Alemania) 40: 794-799.
- ORDUZ, S.; DIAZ, T.; RESTREPO, N.; PATIÑO, M.M.; TAMAYO, M. 1996. Biochemical, immunological and toxicological characteristics of the crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (Brasil) 91: 231-237.
- ORDUZ, S.; REALPE, M.; ARANGO, R.; MURILLO, L.A.; DELÉCLUSE, A.; 1998. Sequence of the *cry11Bb1* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and toxicity analysis of its encoded protein. *Biochimica et Biophysica Acta* (Holanda) 1388: 267-272.
- OTIENO-AYAYO, Z.; CHIPMAN, D.M.; ZARITSKY, A.; KHAWALED, K. 1993. Integrity of the 130 kDa polypeptide of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*  $\delta$ -endotoxin in K-S sporulation medium. *Insect Science and Applications* (Estados Unidos) 14: 377-381.
- RAJAMOCHAN, F.; LEE, M.K.; DEAN, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: Molecular mode of action. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Estados Unidos) 60: 2-27.
- RAYMOND, M. 1985. Presentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinnateur. *Cah. ORSTOM, Ser. Ent. Med. Parasitol* (Francia) 22: 117-121.
- REIM, D.F.; SPEICHER, D.W. 1997. N-terminal sequence analysis of proteins and peptides. *In: Current Protocols in Protein Science* (Comité editorial Coligan, J. E. et al.) pp. 11.10.1-11.10.38. John Wiley and Sons, Inc. (Estados Unidos).
- RESTREPO, N.; GUTIERREZ, D.; PATIÑO, M.M.; THIÉRY, I.; DELÉCLUSE, A.; ORDUZ, S. 1997. Cloning, expression and toxicity of a mosquitocidal toxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (Brasil) 92: 257-262.
- THIÉRY, L.; DELÉCLUSE, A.; TAMAYO, M.C.; ORDUZ, S. 1997. Identification of a gene for Cyt1A-like hemolysin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and expression in a crystal-negative *B. thuringiensis* strain. *Applied and Environmental Microbiology* (Estados Unidos) 63: 468-473.
- TOJO, A.; AIZAWA, K. 1983. Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombyx mori*. *Applied and Environmental Microbiology* (Estados Unidos) 45: 576-580.
- YANG, Y.J.; DAVIES, D.M. 1971. Digestive enzymes in the excreta of *Aedes aegypti* larvae. *Journal of Insect Physiology* (Inglaterra) 17: 2119-2123.