

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS



PREDICION *in silico* DE LOS DOMINIOS ESTRUCTURALES DE LAS TOXINAS  
DE PS2Aa1 Y PS4Aa1 IMPLICADOS EN EL MODO DE ACCION HACIA  
CELULAS HUMANAS ANORMALES

Por

FATIMA DEL CARMEN RETA ALDABA

Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ORIENTACION EN MICROBIOLOGIA

Septiembre, 2017

PREDICCIÓN *in silico* DE LOS DOMINIOS ESTRUCTURALES DE LAS  
TOXINAS DE PS2Aa1 Y PS4Aa1 IMPLICADOS EN EL  
MODO DE ACCIÓN HACIA CELULAS  
HUMANAS ANORMALES

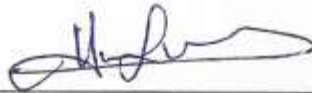
Comité de tesis



---

Dr. Benito Pereyra Alferez

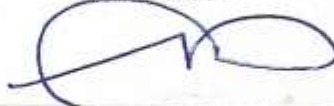
Director de Tesis



---

Dr. Hugo Alberto Luna Olvera

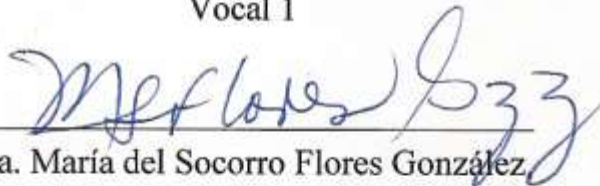
Secretario



---

Dr. Luis Jesús Galan Wong

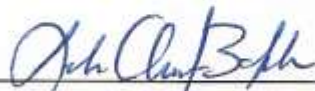
Vocal 1



---

Dra. María del Socorro Flores González

Vocal 2



---

Dra. Isela Quintero Zapata

Vocal 3

PREDICCIÓN *in silico* DE LOS DOMINIOS ESTRUCTURALES DE LAS  
TOXINAS DE PS2Aa1 Y PS4Aa1 IMPLICADOS EN EL  
MODO DE ACCIÓN HACIA CELULAS  
HUMANAS ANORMALES

Dirección de tesis



---

Dr. Benito Pereyra Alferez  
Director de Tesis



---

Dra. Astrid Nalleli Espino Vázquez  
Director externo

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CONACYT por el otorgamiento de la beca de la maestría durante el tiempo correspondiente.

Al Dr. Benito Pereyra por aceptarme en su laboratorio, por las facilidades otorgadas durante el proyecto, por sus enseñanzas, por su confianza y sobre todo por su empatía y carácter que lo hacen magnifico investigador, pero sobre todo un gran ser humano.

Al Dr. Luis Jesús Galán Wong, Dr. Hugo Alberto Luna Olvera, Dra. María del Socorro Flores González y Dra. Isela Quintero Zapata que integran mi comité tutorial.

A la Dra. Astrid Nalleli Espino Vázquez que fungió como asesora externa, guía, compañera y cómplice para poder concretar este proyecto, sin su ayuda no lo hubiera logrado.

Al área de Posgrado por el apoyo brindado en los casos necesarios.

A mis padres y mi esposo por su invaluable ayuda apoyo y ánimos, ya que sin ellos no habría podido seguir adelante.

A la vida... por todo lo que me ha dado.

## DEDICATORIAS

Para mis hijos Paquito y Andrea... porque no hay nada mejor que el ejemplo.

Para Paco. Por ser mi aliado, cómplice y paño de lágrimas en esos momentos de desesperación. ¡Te amo!

Para mis papás, sin ellos esto simplemente no habría podido ser. Si volviera a nacer y me dieran a escoger, sin duda serian ustedes. ¡una y mil veces más!  
GRACIAS POR TODO.

Para el resto de mi familia. MI HERMANA, siempre cómplice y apoyo. Mi suegra, que me ayudo en varias ocasiones cuidando a mi Paquito. MIL GRACIAS.

Para mis amigos de generación, Laiju, Linda, Martha, Joel. Sin ellos y esos ratos de risa y diversión, el camino hacia la meta hubiera sido muy difícil.

Para mis compañeros de laboratorio, Zanya (alguien esencial en mis experimentos), Saúl (alguien esencial para mantenernos bien nutridos), Astrid (gracias...gracias y mil gracias), Hugo, Ramiro, Cesar, Miguel, Chuy, Claudia, Jessy, Alan. Will, y a aquellos que estuvieron y convivieron conmigo, aunque fuera un poquito. Esos ratos de comida, risas, regaños y convivencia fueron de lo mejor. Arriba el L4!!

Gracias DIOS, gracias VIDA; una de la mano del otro.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCION .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	3
2.2 $\delta$ -Endotoxinas .....	4
2.2.1 Parasporinas .....	4
2.2.2 Parasporina 2.....	5
2.2.3 Parasporina 4.....	6
2.3 Otras toxinas formadoras de poro.....	7
2.4 Proteínas modeladas <i>in silico</i> y proteínas modificadas.....	8
3. JUSTIFICACION .....	10
4. HIPOTESIS.....	11
5. OBJETIVOS .....	12
5.1 Objetivo general.....	12
5.2 Objetivos particulares.....	12
6. MATERIAL Y METODOS.....	13
6.1 Análisis de las estructuras primarias.....	13
6.1.2 Alineamientos múltiples .....	13
6.1.3 Caracterización físico-química de las proteínas .....	14
6.2 Estructuras secundarias y terciarias.....	14
6.2.1 Visualización y análisis de las proteínas en 3D.....	14
6.3 Predicción de regiones estructurales con posible actividad biológica.....	15
6.3.1 Determinación de aminoácidos y secuencias clave para el modo de acción .....	15
6.3.2 Diseño de mutantes y quimeras .....	15
6.3.3 Construcción de vectores de expresión.....	15
7. RESULTADOS.....	17
7.1 Similitud de PS2Aa1 con otras proteínas.....	17

7.2	Similitud de la PS4Aa1 con otras proteínas.....	20
7.3	Propiedades fisicoquímicas de la PS2Aa1 y PS4Aa1.....	24
7.3.1	Parámetros relacionados a la estabilidad y solubilidad de las proteínas .....	24
7.4	Deducción de los dominios estructurales de las parasporinas 2 y 4.....	26
7.4.1	Estructura tridimensional de las protoxinas.....	26
7.5	Alineamientos estructurales.....	28
7.6	Anotación de los dominios estructurales.....	30
7.7	Modelamiento de Quimeras.....	34
7.7.1	Intercambio de dominio I .....	34
7.8	Quimeras finales.....	37
7.8.1	Anotación de los dominios estructurales de las quimeras. ....	38
7.8.2	Alineamientos estructurales.....	41
7.8.3	Propiedades fisicoquímicas de las Quimeras .....	44
7.9	Construcción del vector de expresión.....	45
8.	DISCUSIÓN .....	53
9.	CONCLUSIONES .....	60
10.	PERSPECTIVAS .....	61
11.	BIBLIOGRAFIA .....	62
12.	RESUMEN BIOGRÁFICO.....	71

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
TABLA 1- listado de las principales secuencias aminoacídicas utilizadas en este estudio .....	13
TABLA 2- BLAST de la secuencias aminoacídica de la PS2Aa1 ...	18
TABLA 3- BLAST de la secuencia aminoacídica de la PS2Aa1 con un valor esperado significativo .....	20
TABLA 4- BLAST de la secuencia aminoacídica de la PS2Aa1 con poco valor significativo .....	21
TABLA 5- Propiedades físicas y químicas de la PS2Aa1 .....	25
TABLA 6- similitud estructural de las parasporinas con otras proteínas cristalizadas .....	30
TABLA 7- Resultado de la predicción de las nuevas parasporinas modeladas .....	38
TABLA 8- Propiedades físicas y químicas de las quimeras PS2 y PS4 .....	44



## ÍNDICE DE FIGURAS

Página

FIGURA 1. Alineamiento de las secuencias con mayor similitud a las PS2Aa1 .....	17
FIGURA 2. Árbol filogenético de la PS2Aa1 .....	19
FIGURA 3. Alineamiento múltiple de la PS4Aa1 con toxinas de la superfamilia ETX-MTX2.....	22
FIGURA 4. Árbol filogenético de la PS4Aa1 con diferentes toxinas de la superfamilia ETX-MTX2 .....	23
FIGURA 5. Predicción de las estructuras cristalográficas de las protoxinas ...	27
FIGURA 6. Dominio PFAM conservado de las estructuras terciarias.....	28
FIGURA 7. Alineamiento estructural de las quimeras con la PS2Aa1 y la PS4Aa1 .....	29
FIGURA 8. Anotación de los dominios estructurales de la secuencia de la PS2Aa1 .....	31
FIGURA 9. Anotación de los dominios estructurales de la secuencia de la PS4Aa1 .....	32
FIGURA 10. Identificación de los dominios estructurales de la PS2Aa1 y PS4Aa1 .....	33
FIGURA 11. Alineamiento estructural de la PS2Aa1 y PS4Aa1.....	34
FIGURA 12. Alineamiento estructural entre la PS2Aa1 y PS4Aa1.....	35
FIGURA 13. Predicción estructural de algunas quimeras con intercambio del dominio I .....	36
FIGURA 14. Predicción estructural de las quimeras seleccionadas.....	37
FIGURA 15. Anotación de los dominios estructurales de la quimera PS2 .....	39
FIGURA 16. Anotación de los dominios estructurales de la quimera PS4.....	40
FIGURA 17. Alineamiento de las quimeras con su templado .....	42
FIGURA 18. Alineamiento estructural de las quimeras con las parasporinas 2 y 4 .....	43
FIGURA 19. Vector de expresión pET-23a(+) .....	45
FIGURA 20. Secuencia desarrollada del vector pET-23a(+) .....	47
FIGURA 21. Construcción y secuencias condensadas del vector con el gen para PS2Aa1 .....	48
FIGURA 22. Construcción y secuencias condensadas del vector con el gen para PS4Aa1 .....	49
FIGURA 23. Construcción y secuencias condensadas del vector con el gen de la Quimera de la PS2 .....	50
FIGURA 24. Construcción y secuencia condensada del vector con el gen de la quimera de la PS4 .....	51

## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

$\alpha$	Alfa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool”
$\beta$ -TPF	Toxinas formadoras de poro beta
Bt	Bacillus thuringiensis
$\delta$	Delta
ETX	Epsilon Toxin
GRAVY	"Grand Avergae of Hidropaty"
II	Índice de Inestabilidad
kDa	kilodaltones
MTX2	Mosquitocidal Toxin 2
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDB	"Protein Data Base "
Pfam	"Protein Families"
pH	Potencial Hidrogeno
pI	Punto Isoelectrico
PS	Parasporinas

## RESUMEN

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria gran positiva, formadora de esporas, la cual produce unos cristales parasporales denominadas como toxinas Cry, que son efectivas específicamente contra ciertos insectos, debido a que en al menos uno de sus dominios estructurales presentan una región que le da especificidad para ciertos tipos de receptores en las células. En contraste se tienen otras proteínas que no son insecticidas pero que presentan una actividad citotóxica contra ciertas células cancerígenas humanas, estas toxinas son llamadas parasporinas, las cuales son producidas también por diferentes cepas de Bt como inclusiones parasporales. En la actualidad se han identificado 19 tipos diferentes de parasporinas agrupándose en 6 familias. Dentro de los diferentes tipos de parasporinas destacan las familias PS2 y PS4 que han mostrado mayor toxicidad hacia las células blanco. En este trabajo fueron predichas, modificadas y modeladas *in silico* las estructuras de las proteínas denominadas como parasporinas PS2Aa1 y PS4Aa1. Con ayuda de diferentes herramientas bioinformáticas, estas proteínas fueron analizadas en su estructura primarias para evaluar su similitud con otras secuencias de aminoácidos, mismas que resultaron pertenecer a un grupo de proteínas formadoras de poro beta, se analizaron las características fisicoquímicas, mismas que en su mayoría fueron correspondientes las características de proteínas transmembranales. Una vez que se tuvieron esos datos, se mandaron modelar a la plataforma Raptor X, donde se arrojó la estructura tridimensional de ambas proteínas compuestas por tres dominios, el dominio I conformado por hélices alfa y láminas beta, el dominio II conformado por laminas beta y en donde se encuentra la horquilla anfipática, y dominio III conformado por laminas beta. Estos modelos coincidían con las ya dilucidadas en investigaciones previas. Para el modelamiento *in silico* de las quimeras PS2 y PS4 se realizó un intercambio del dominio I entre ambas parasporinas el cual se presenta como el dominio más variable y al parecer responsable del modelado del resto de los dominios, por lo cual se sospecharía que pudiera ser el dominio para la especificidad hacia células blanco. Los dominios II y III al parecer resultan ser los dominios más conservados de las proteínas, tanto de las nativas como de las quimeras.

## ABSTRACT

A ubiquitous Gram-positive bacterium, *Bacillus thuringiensis* (Bt), produces parasporal crystalline inclusions called Cry proteins, in at least one of the structural domains these proteins presents a specific recognized receptor for different types of cells. On the other hand, Bt strains have long aroused little attention, recent screenings of such strains for cytotoxic activity have identified several strains that produce novel crystal proteins with preferential cytotoxicity against particular human carcinoma cells. This group of crystal proteins has been named parasporins. They have been identified 19 types of parasporin by grouping in 6 families. Within the different types of parasporins PS2 and PS4 have been well studied showing high toxicity to target cells. In this work the structures of proteins called parasporins PS2Aa1 and PS4Aa1 were predicted, modified and modeled *in silico*. With the help of different bioinformatic tools, these proteins were analyzed in their primary structure to evaluate their similarity with other amino acid sequences, which resulted to belong to a group of beta-pore-forming proteins. The physical and chemical parameters were analyzed, and the characteristics of transmembrane proteins were corresponding. Once these data were taken, the model was sent to the Raptor X platform, where the three-dimensional structure of both proteins composed of three domains, domain I made up of alpha helices and beta sheets, domain II conformed by beta sheets and where the amphipatic hairpin is found, and domain III conformed by beta sheets, were predicted. These models coincided with those already elucidated in previous research. For the *in silico* modeling of the PS2 and PS4 chimeras an exchange of the domain I between both parasporins was carried out which is presented as the most variable domain and apparently responsible for the modeling of the rest of the domains, reason why it would be suspected the domain for target cell specificity. Domains II and III appear to be the most conserved domains of both native and chimeric proteins.

# 1. INTRODUCCION

*Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria gram positiva, formadora de esporas que produce cristales, los cuales son inclusiones proteicas conocidas como endotoxinas. Las endotoxinas de Bt son bien conocidas como proteínas con actividad insecticida (Cry) o hemolítica (Cyt) (Schnepf *et al.*, 1998). La gran familia de proteínas Cry está formada por 40 diferentes grupos. La estructura tridimensional de las proteínas Cry insecticidas tiene alta similitud. Se piensa que las proteínas Cry insecticidas se unen a la superficie de la membrana apical de las células epiteliales columnares de insectos susceptibles, donde generalmente forman poros y eventualmente provocan un desequilibrio osmótico en las células y eventualmente la muerte de las larvas por septicemia (Höfte *et al.*, 1989; Schnepf *et al.*, 1998).

Otro tipo de proteínas Cry son las parasporinas, que tienen capacidad para matar ciertas células tumorales humanas, no presentan actividad insecticida, y están ampliamente distribuida a nivel mundial (Mizuki *et al.*, 2000). Hasta ahora, 19 parasporinas, distribuidas en 6 grupos diferentes, han sido designadas por el comité de clasificación y nomenclatura de parasporinas, aunque se han reportados proteínas tipo parasporinas sin registrar en diferentes partes del mundo (Okumura *et al.*, 2014).

En cuanto a su estructura tridimensional, las parasporinas se pueden clasificar en 2 grupos: i) aquellas con la estructura típica de tres dominios como las Cry insecticidas y ii) aquellas con relación estructural a Toxinas Formadoras de Poros (TFPs) tipo  $\beta$ . En esta última clasificación se encuentran la parasporinas 2 y 4 (PS2 y PS4), las cuales están comprendidas por tres dominios estructurales, en donde el dominio I está conformado por hélices alfa y láminas beta antiparalelas, el dominio II está compuesto por laminas beta antiparalelas, aquí se encuentra un motivo denominado como horquilla antipática, la cual

se cree tiene función de anclaje y oligomerización. El dominio III está conformado específicamente de láminas beta antiparalelas (Akiba *et al.*, 2006; Akiba *et al.*, 2008)

En estudios anteriores el modelamiento *in silico* de proteínas ha sido exitoso para la predicción de funciones biológicas en toxinas y/o dominios estructurales de las mismas (Jaimes, 2012). En este trabajo y con ayuda de diferentes herramientas bioinformáticas, se hizo la predicción de dominios estructurales con posible función biológica hacia sus células blanco de las parasporinas PS2Aa1 y PS4Aa1 y se diseñaron nuevas proteínas quiméricas en donde se intercambió el dominio I entre ambas parasporinas. Los resultados obtenidos de estos análisis, pudieran ser de gran importancia para el entendimiento sobre el rol de los dominios y sus conformaciones en la función específica de estas proteínas y de esta manera se pudieran mejorar y quizá ampliar el rango de células blanco y de esta manera ser utilizadas en un futuro como tratamiento anti cáncer.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Bacillus thuringiensis*

En 1902 el científico japonés Shigetane Ishiwata aisló una bacteria de larvas muertas mientras investigaba la denominada “enfermedad de sotto” (enfermedad de colapso repentino), esta enfermedad fue responsable de la pérdida de grandes cantidades de gusanos de seda en Japón y regiones circundantes, nombrándola así *Bacillus sotto*. Años después, en 1911, el científico alemán Ernst Berliner aisló una cepa relacionada a partir de larvas de la polilla de harina del mediterráneo, en el distrito de Thuringia, Alemania, años después, en 1915 Berliner, llamó apropiadamente al organismo *Bacillus thuringiensis*, y describió cuerpos de inclusión junto a la endospora, a los que llamó cuerpos de desecho o “restkörper”. Posteriormente en 1953 Christopher Hannay acuñó la frase “cristales paraesporales” y en el año de 1955 Junto con Philip Fitz-James, descubrieron que los cristales paraesporales están compuestos por proteínas.

*B. thuringiensis* es una bacteria gram positiva, anaerobia facultativa, flagelada que pertenece a la familia *Bacillaceae*, esta morfológica y genéticamente relacionada con *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*, pero ha sido clasificado por separado, principalmente por la síntesis del cristal proteico (Höfte, 1989). Los aislados de *B. thuringiensis* han sido encontrados en todo el mundo (Heimpel, 1967).

El ciclo de vida de *B. thuringiensis* se caracteriza por dos fases que corresponden al crecimiento y división celular, o fase vegetativa y fase de esporulación la cual se desencadena frente a situaciones adversas como estrategia de sobrevivencia mediante el desarrollo de endosporas e inclusiones paraesporales cristalinas (Angus, 1956). Esta inclusión paraesporal a menudo contiene una o más proteínas denominadas como  $\delta$ -endotoxinas, que pueden ser tóxicas a insectos, u otros invertebrados, como nematodos (Schnepf et al., 1998).

## 2.2 $\delta$ -Endotoxinas

Las  $\delta$ -endotoxinas se clasifican en 2 grupos principales, que presentan características bioquímicas y biológicas diferentes: las proteínas Cry, que se definen como proteínas de inclusión paraesporal (cristal) de *B. thuringiensis* que exhiben algún efecto toxico experimentalmente verificable hacia algún organismo específico ó cualquier proteína que tenga una secuencia similar a alguna proteína Cry conocida; y las proteínas Cyt, que se definen como proteínas de inclusiones paraesporales (cristal) que exhiben actividad hemolítica, ó cualquier proteína que tenga una secuencia obvia similar a proteínas Cyt conocidas (Schnepf, 1998).

### 2.2.1 Parasporinas

A partir de los cristales paraesporales de más de 1700 cepas, se reportó una fuerte actividad citotóxica hacia células cancerígenas humanas asociada también con inclusiones paraesporales de *B. thuringiensis* denominadas como parasporinas. Se purificaron las inclusiones paraesporales de tres cepas seleccionadas, que no presentaron ni actividad hemolítica ni insecticida, pero si una alta actividad citotóxica contra células de leucemia y otras células de cáncer, exhibieron un espectro de toxicidad diferente y niveles variados de actividad (Mizuki *et al.*, 1999). Las parasporinas engloban proteínas Cry genealógicamente heterogéneas, su notable característica principal es la citotoxicidad preferencial que presenta hacia células humanas cancerígenas de diversos orígenes (Lee, 2000).

En el año de 2008 se describió el modo de acción de una proteína aislada de *B. thuringiensis* en Malasia la cual, mostraba actividad citotóxica preferencial por células leucémicas humanas (CEM-SS), y no fue toxica para células T normales u otras líneas celulares de cáncer, como la de cáncer cervicouterino (HeLa), cáncer mamario (MCF-7) o cáncer de colon (HT-29). (Nadarajah, 2008).



Actualmente se reconocen 19 parasporinas y se han clasificado en 6 familias, observándose marcadas diferencias en el espectro de acción y los niveles de actividad entre estos 6 grupos (Okumura 2014). Para este estudio se seleccionaron las PS2 y PS4, que son de las mejor descritas a la fecha, además de que presentan el mejor espectro citotóxico hacia células cancerígenas.

### **2.2.2 Parasporina 2**

La parasporina 2 es una TFP con un tamaño de 339 residuos de aminoácidos y un peso de 37k Da (Akiba *et al.*, 2008). Tiene un espectro citotóxico amplio hacia diversas líneas celulares como MOLT-4 y HeLa, entre otras (Mizuki *et al.*, 2000). Esta parasporina consta de tres dominios, conformados por hélices alfa y, en su mayoría, láminas beta (Akiba, 2008). El modo de acción de esta parasporina activada por proteasas induce marcadas alteraciones morfológicas a las células como la formación de vacuolas en la membrana, alteraciones citoesqueléticas, así como fragmentaciones de retículo endoplásmico y mitocondrial (Kitada *et al.*, 2006).

Al igual que las demás parasporinas, la Parasporina 2 necesita ser activada por proteinasa K hacia sus extremos N y C-terminal para adquirir su forma tóxica. La PS2 activa muestra unión específica y una variedad de efectos citotóxicos en contra de las células cancerígenas de hepatocito humano. (Abe 2005).

En el 2008 se obtuvo la estructura tridimensional por cristalografía de la parasporina 2, la cual consta de tres dominios conformados por hélices alfa y láminas beta, con dimensiones de 115x30x29 Å. El dominio 2 contiene un canal formado por una horquilla beta que le da las características de toxina tipo aerolisina y al parecer se involucra en la formación de poros (Akiba 2008).

### 2.2.3 Parasporina 4

En la cepa A1470 de *B. thuringiensis* serovariedad *shandongiensis* se encontraron proteínas de inclusión paraesporal, que exhiben fuerte citotoxicidad contra células T humanas leucémicas cuando son activadas por tratamientos con proteasas; estas no exhiben actividad hemolítica o insecticida (Okumura 2005). Se confirmó que esta cepa produce por lo menos dos tipos de proteínas citotóxicas con peso molecular similares de 28kDa. La identificación y caracterización de cada una de las toxinas dio pie a la designación de una de ellas dentro del grupo de la parasporina 2 y a la otra dentro de una nueva categoría, la parasporina-4 (PS4) por el comité de nomenclatura y clasificación, y designada como Cry45Aa por el comité de nomenclatura de  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis* (Okumura 2008).

La PS4Aa1 (Cry45Aa1), está conformada por 275 residuos de aminoácidos, de peso molecular aproximado de 30,078, codificada por el gen de 1116 pb de longitud, existe poca homología (<30%) en secuencias de aminoácidos entre la PS4Aa1 y el resto de las proteínas paraesporales, incluidas las Cry y Cyt. El fragmento tóxico obtenido por la activación con proteinasa-K muestra un peso aproximado de 26,808. (Okumura 2008).

En 2005 se reportó la actividad de la parasporina-4 recombinante, tratada con proteinasa K, que induce cambios morfológicos en dos cultivos celulares, MOLT-4 y CACO-2. La parasporina-4 mostró fuerte citotoxicidad en las fases tempranas de ambos cultivos. Durante los primeros 10 minutos después de la administración de la proteína citotóxica, comenzó la condensación nuclear que se observó plenamente dentro de la primera hora. Células abombadas se observaron a partir de la segunda hora de la exposición de la proteína, y el estallido celular se observó dentro de las primeras 24 h, llegando a la muerte celular (Okumura, 2005).

Okumura y col. describieron el modo de acción de la PS4 en el cual demostraron su citotoxicidad hacia células CACO-2, Sawano y MOLT-4. Mediante un PSI-BLAST se mostró una similitud de la PS4 con toxinas beta formadoras de poro como la aerolisina. Se mostró que la citotoxicidad de la PS4 sobre células CACO-2 fue exhibida al ser tratada con ciclodextrina la cual induce una baja en la producción de colesterol, por lo tanto, se sugirió que la PS4 era una beta-toxina formadora de poros con actividad independiente de colesterol. (Okumura 2010).

### **2.3 Otras toxinas formadoras de poro**

En el 2001 Miyata y cols. evaluaron la protoxina de la ETX mediante la digestión en distintos aminoácidos en los extremos carboxi y amino terminal, la investigación indico que la digestión en el extremo C- terminal es la responsable de la activación de la toxina y a su vez esencial para la heptamerización en la membrana sinaptosomal de células de ratón (Miyata 2001).

En el 2004 se reportó la estructura cristalizada de la ETX, la cual revelo una similitud estructural con la Aerolisina producida por *Aeromonas hydrophila*; comparando estas dos estructuras, se identificaron las regiones de la proteína que cambian de estado soluble a estado transmembranal (Cole 2004).

En el 2014 se estudió que la Toxina Épsilon (ETX) causa muerte celular mediante la unión a membrana plasmática dada por lo lípidos presentados en la misma utilizando microscopia confocal y de conteo en células MDCK, lo que sugirió el importante rol de una proteína receptora presente en la membranas de las células (Manny 2014).

En el 2015 se mostró que la interacción entre la ETX y la membrana lipídica de las células MDCK, sugiriendo que los componentes sulfatados de la membrana incrementan la actividad de la toxina; en este ensayo se observó que solo en la toxina activada se encontraba una disminución de la actividad al momento de la remoción de los elementos sulfatados, la protoxina mantenía su actividad, lo cual indica que los componentes con elementos sulfatados potencian la oligomerización sugiriendo que la actividad de unión es independiente (Gil 2015).

#### **2.4 Proteínas modeladas *in silico* y proteínas modificadas.**

Jiménez y colaboradores determinaron el papel de los dominios de las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac y su toxicidad, mediante la delimitación y el intercambio entre los dominios de ambas proteínas. Como resultados se observó que uno hubo una variación en la actividad toxica de las quimeras con el intercambio de los dominios I y III. Por otro lado, al intercambiar el dominio II entre ambas proteínas, se encontró la su actividad biológica disminuía, en una de ellas y en la otra aumentaba, por lo cual se indica que un dominio II de una de las proteínas posee mayor afinidad que el otro (Jiménez 1997).

Bokori-Brown y cols. en el 2012 estudiaron una mutante de le ETX denominada H149A en donde se cambiaron los residuos de tirosina expuestos en el dominio I de dicha proteína para evaluar su especificidad de unión a membrana de células MDKC y por lo tanto reducción de su toxicidad; por el contrario, encontraron que el dominio III de esta proteína reconocía células ACHN por lo cual indicaba que esta proteína mutante puede reconocer diferentes receptores celulares (Bokori-Brown 2012).

Jaimes en el 2012 realizo la predicción *in silico* de la estructura y función de la proteínas hipotética p284 de *T. cruzi*, comparando la secuencia de la proteínas obtenida,

obteniendo sus propiedades físicas y químicas, modelado su estructura tridimensional obteniendo un resultado en el cual se sugiere que la proteína hipotética p284 pertenece al grupo de proteínas MutS2 implicadas en los eventos de recombinación, reparación y dimerización del ADN, así como la similitud de la estructura con otras proteínas que contienen el dominio Smr que es característica de las proteínas MutS2 (Jaimes 2012).

En el 2006, Fang y colaboradores debido a una nula toxicidad de la proteína Vip3Ac1 hacia el taladro del maíz europeo, una plaga que da grandes pérdidas en los cultivos de maíz, se dieron a la tarea de producir una toxina quimérica que tuviera una fuerte actividad tóxica contra esta plaga y otras más, por lo cual mutaron la proteína Vip3Ac1 la cual mantenía su región N-terminal e intercambiaba la región C-terminal con la de la toxina Vip3Aa1. La quimera Vip3AcAa mostró fuerte toxicidad hacia el taladro del maíz y sugirió que estas toxinas son fuertes candidatas para la ingeniería genética en el control biológico (Fang, 2006).

Lucena y colaboradores de acuerdo a estudios previos realizados donde se evalúan las toxinas del tipo insecticida de Bt, así como el estudio de proteínas mutantes que mejoran la acción biológica de la toxina, describen la evolución de las proteínas Cry de manera natural e *in vitro*, así como también el uso de la recombinación de ADN para mejorar dos toxinas de Bt mediante el análisis *in silico* de sus propiedades y la evaluación de su estructura y citotoxicidad (Lucena 2014).

### 3. JUSTIFICACION

La necesidad de desarrollar nuevos y eficaces tratamientos contra el cáncer radica en el incremento de números de casos de este padecimiento a nivel mundial, donde las personas que lo presentan se ven orilladas a tomar un rango muy limitado de tratamientos que son extremadamente agresivos para la integridad del paciente, sin asegurar la erradicación completa del cáncer. Es por esto que las nuevas terapias deben estar dirigidas de manera específica y selectiva a las células enfermas.

En este sentido, las parasporinas parecen ser candidatas ideales como agentes terapéuticos selectivos capaces de actuar únicamente sobre las células anormales, los antecedentes señalan a la parasporina 2 y 4 como toxinas formadoras de poros en la membrana plasmática de células cancerígenas blanco. Es por esto que la predicción y modificación *in silico* de los dominios estructurales de la PS2Aa1 y PS4Aa1 implicados en el modo de acción hacia células cancerígenas humanas nos puede dar un entendimiento más amplio de la importancia que presenta la estructura de estas proteínas. De igual forma, su modificación nos ayudaría a mejorar su acción biológica o ampliar su efecto hacia otro tipo de células blanco, mismo que haría más fácil su uso como tratamiento anti cáncer. A su vez, este trabajo podría dejar un importante antecedente acerca del uso de las herramientas bioinformáticas en la predicción, modificación y mejoramiento de proteínas.

## **4. HIPOTESIS**

Es posible determinar y modificar *in silico* los dominios estructurales de la PS2Aa1 y PS4Aa1 implicados en el modo de acción hacia células humanas anormales en base a las estructuras terciarias de toxinas relacionadas.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

- Determinar la estructura tridimensional y dominios funcionales de las proteínas PS2Aa1 y PS4Aa,1 mediante el modelamiento *in silico* y diseño de quimeras generadas a través del intercambio de dominios estructurales implicados en la actividad biológica específica de las parasporinas.

### 5.2 Objetivos particulares

- Determinar la relación estructural de las proteínas PS2Aa1 y PS4Aa1 con otras proteínas de referencia a nivel de estructura primaria y terciaria.
- Predecir *in silico* los dominios estructurales de la PS2Aa1 y PS4Aa1.
- Diseñar nuevas parasporinas quiméricas por medio del intercambio de dominios funcionales entre PS2Aa1 y PS4Aa1, que conserven la actividad biológica específica hacia células anormales.
- Generar modelos en 3D de las proteínas quiméricas de PS4Aa1 y PS2Aa1.
- Predecir *in silico* las características físicas y bioquímicas de las parasporinas quiméricas.
- Diseñar genes sintéticos para la expresión heteróloga de las parasporinas nativas y quiméricas.



## 6. MATERIAL Y METODOS

### 6.1 Análisis de las estructuras primarias

#### 6.1.1 Secuencias aminoacídicas

Para el análisis *in silico* se descargaron en formato FASTA y GenPept (que incluye todas las anotaciones), las secuencias aminoacídicas de las principales proteínas usadas para el análisis de la base de datos del GenBank<sup>®</sup> del sitio del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (ver tabla 1).

Una vez obtenidas las secuencias de las PS2Aa1 y PS4Aa1, se identificaron las secuencias aminoacídicas responsables de la actividad biológica, con ayuda del software GENTle (Universidad de Colgne) y UNIPRO UGENE versión 1.26. A partir de aquí el análisis bioinformático se realizó tanto con las secuencias de protoxinas, como de las toxinas.

**TABLA 1. Listado de las principales secuencias aminoacídicas usadas en este estudio.**

Proteína	Organismo	No. Acceso	Autor(es)
PS2Aa1	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar dakota	AB099515.1	Ito,A., Sasaguri,Y., Kitada,S., Kusaka,Y., Kuwano,K., Masutomi,K., Mizuki,E., Akao,T. and Ohba,M.
PS2Aa2	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar shandongiensis	AB454419.1	Okumura,S., Ishikawa,T., Saitoh,H., Akao,T. and Mizuki,E.
PS2Ab1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	AB186914.1	Hayakawa,T., Kanagawa,R., Kotani,Y., Kimura,M., Yamagiwa,M., Yamane,Y., Takebe,S. and Sakai,H.
PS4Aa1	<i>Bacillus thuringiensis</i> Serovar shandongiensis	AB180980.2	Okumura,S., Saitoh,H., Wasano,N., Katayama,H., Higuchi,K., Mizuki,E. and Inouye,K

### **6.1.2 Alineamientos múltiples**

Las secuencias de las dos parasporinas fueron analizadas por medio de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), con los algoritmos protein-BLAST (similitud total con otras proteínas), PSI-BLAST (que busca similitudes en secuencias conservadas) y CDART BLAST (que encuentra dominios estructurales conservados en la secuencia). También alineamientos múltiples con secuencias de proteínas formadoras de poro de referencia se hicieron con el algoritmo COBALT BLAST (herramienta de alineamientos múltiples) y con el software UGENE, que sirvió principalmente para la creación de las imágenes de alineamientos y anotación de secuencias.

### **6.1.3 Caracterización físico-química de las proteínas**

Con base en las secuencias primarias de las dos parasporinas se determinaron las características fisicoquímicas básicas de las proteínas utilizando la herramienta ProtParam del portal ExPASy (Swiss Institute of Bioinformatics).

## **6.2 Estructuras secundarias y terciarias**

La predicción de las estructuras tridimensionales de las protoxinas y toxinas de PS2Aa1 y PS4A1 fueron hechas en los portales RaptorX Structure Prediction (<http://raptorx.uchicago.edu>) y SWISS-MODEL (del Swiss Institute of Bioinformatics), los cuales usan la base de datos templados del Protein Data Bank y SWISS-MODEL library. Todas las estructuras generadas fueron almacenadas en formato PDB. Por otra parte, también se descargaron en formato PDB, las estructuras de toxinas de referencia como aerolisina y épsilon.

### **6.2.1 Visualización y análisis de las proteínas en 3D**

Las estructuras predichas de nuestras parasporinas y de otras toxinas cristalizadas y reportadas previamente fueron visualizadas y analizadas con el software PyMOL y UGENE, mismos que además sirvieron para hacer alineamientos estructurales.

## **6.3 Predicción de regiones estructurales con posible actividad biológica**

### **6.3.1 Determinación de aminoácidos y secuencias clave para el modo de acción**

Los posibles dominios estructurales de las dos parasporinas se predijeron haciendo alineamientos múltiples con proteínas de referencia (usando las herramientas bioinformáticas anteriormente descritas). La anotación de los dominios predichos se guardó en formato GB. Así mismo, se identificaron los posibles aminoácidos que pudieran ser claves para el modo de acción de las parasporinas formadoras de poro, ya sea en el reconocimiento de receptor, oligomerización o inserción a membrana.

### **6.3.2 Diseño de mutantes y quimeras**

Como perspectiva para trabajos posteriores, se planteó el diseño de quimeras y mutantes de PS2Aa1 y PS4Aa1 que pudieran ser usadas para comprobar el papel de ciertos residuos de aminoácidos y secuencias estructurales que sean clave para la actividad biológica de las parasporinas.

La construcción de quimeras se realizó mediante el intercambiando del dominio predicho como responsable de la formación de poros de membrana, entre la PS2Aa1 y la PS4Aa1. Para las mutantes se diseñó el intercambio de residuos identificados como clave, por otros de características bioquímicas antagónicas. Las estructuras tridimensionales de quimeras y mutantes fueron diseñadas con RaptorX, SWISS-MODEL y visualizadas con PyMOL y UGENE.

### **6.3.3 Construcción de vectores de expresión**

Por último, se seleccionó un vector donde se pudieran expresar de manera heteróloga las parasporinas nativas y quimeras diseñadas. Para las construcciones, las secuencias de proteínas fueron convertidas a secuencias nucleotídicas con codones preferenciales para *Escherichia coli*, y clonadas *in silico* con uso de SnapGen y UGENE.

Para el diseño de mutantes de residuos, se diseñaron una serie de cebadores que pudieran ser utilizados en experimentos de Mutagénesis sitio dirigida usando como templado los vectores construidos con las secuencias nativas de las dos parasporinas. El diseño de iniciadores se hizo “a mano” y la validación para la PCR se hizo *in silico* con la herramienta OligoAnalyzer 3.1 del sitio de Integrated DNA Technologies, Inc. La cual determina las propiedades fisicoquímicas, incluyendo la T<sub>m</sub>, formación de estructuras secundarias, dímeros y mismatches.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Similitud de PS2Aa1 con otras proteínas

El BLAST de la PS2Aa1 contra proteínas de referencia dio como resultado una alta similitud con proteínas hipotéticas de *Acidobacteriaceae bacterium*, *Proteobacteria bacterium*, *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, etc. En la Tabla 2 se observan todas las proteínas que presentan mayor similitud.

Aunque el PROTEIN BLAST o el PSI-BLAST de la secuencia primaria de la PS2Aa1 no mostró similitud con toxinas como aerolisina o épsilon, si tuvo un considerable porcentaje de similitud ( $\leq 38\%$ ) con diversas hidralisinas tanto de *Bacillus sp.* como de otros géneros bacterianos. Estas son un grupo de  $\beta$ -TFP aisladas inicialmente en cnidarios que se unen a la membrana de eritrocitos generando poros de un diámetro aproximad de 1.2nm (Sher *et al.*, 2005). Ver Figura 1 y 2.

```

Query_235088 208 KSVTVTVPAQSRRTIQLTAKIAKESADFSAPITVDGYFGANFPKRVGpgGHYFWFNPARDVLNNTTSG-TLRGTVTNVSSF 286
WP_020721402 157 ASVSVSVPAAHSRKQITMVATMQQETLNF TAPISVQGMFGANFPDRVK--GHYFWFN DATQLLPTTSG-QIKGSI NTSAL 233
WP_025219377 160 AKIEVTVPPRSKKKIVIVGTLKKE TMHFRAPIFVNGMFGANFPKKVQ--DHYFWFLN AASVLKNTSG-EITGTIRNSAVF 236
XP_002159263 156 SSIQVTVPPRSKVCVNMVGV LKKEKVF FEVPVTVDGSFGANFRSQVQ--GHYYWFI GANKALSSTG-IIGTIDHACVF 232
WP_086411930 157 IEHSIKVPPNSKMKIAMIGTLITEVLHFQSIIITVQGMFGACFPRMVR--GHYIGFKSAGHILNKTFG-IIEGSINNTAIQ 233
WP_016082893 157 IEHSIKVPPNSKMKIAMIGTLITEVLHFRSIIITVQGMFGACFPRMVR--GHYVGFKSAGHILNKTFG-MIEGSINNTALQ 233
WP_086389158 157 IEQSIKVPNSKMKIEMIGTLITEVLHFQSIIITVQGMFGACFPRMVR--GHYVGFKSAGHILNKTFG-IIEGSINNTVLQ 233
WP_024772743 247 VRSEIIPPKSKRRVIMTQPVSETKMEYRIPVYTSGGIGANFGHRVD--GHYFRFTRINRLLDSDGRKEQ RGFVYTKTAY 324
WP_052137490 1 -----MVGTMKQEVMGFQAPLSVQGSFGANFPSKVE--DHYFWFLGAESVLDSTTG-TLVGKIKNTAVF 61

Query_235088 287 DFQTI VQPARSL LDEQQETL [ 32] 338
WP_020721402 234 HVQTTVGKAEPVAALAASSK 253
WP_025219377 237 DVHTEIGQTEPLTVEELNEF [ 4] 260
XP_002159263 233 DVSTVVEPSQPL----- 244
WP_086411930 234 DIEINIKGIEPYSYKQKVIK 253
WP_016082893 234 DIEIHIKGI EPYSDKQKVIK 253
WP_086389158 234 DIEIQIKGIEPYSNKQKVIK 253
WP_024772743 325 RANVIAGVVEPLN----- 337
WP_052137490 62 DVQTEVGAAEPITESTV-- 79

```

FIGURA 1. Alineamiento de las secuencias con mayor similitud a la PS2Aa1

**TABLA 2. BLAST de la secuencia aminoacídica de la PS2Aa1**

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">hypothetical protein [Acidobacteriaceae bacterium KBS 96]</a>	210	210	71%	2e-63	45%	<a href="#">WP_020721402.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Lysinibacillus varians]</a>	201	201	74%	1e-59	43%	<a href="#">WP_025219377.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Lysinibacillus sphaericus]</a>	201	201	74%	1e-59	42%	<a href="#">WP_024361905.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Janthinobacterium sp. CG23_2]</a>	199	199	72%	3e-59	44%	<a href="#">WP_054267704.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Lysinibacillus sphaericus]</a>	199	199	74%	9e-59	42%	<a href="#">WP_069512762.1</a>
<a href="#">PREDICTED: hydralysin-like [Hydra vulgaris]</a>	181	181	72%	3e-52	38%	<a href="#">XP_002159263.1</a>
<a href="#">MULTISPECIES: hypothetical protein [Dickeya]</a>	180	180	72%	1e-51	43%	<a href="#">WP_038658938.1</a>
<a href="#">PREDICTED: hydralysin-like [Hydra vulgaris]</a>	178	178	72%	6e-51	38%	<a href="#">XP_002158854.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Pseudoalteromonas luteoviolacea]</a>	167	167	72%	1e-46	41%	<a href="#">WP_065790989.1</a>
<a href="#">hydralysin-2 [Bacillus thuringiensis]</a>	136	136	70%	9e-35	35%	<a href="#">WP_086411930.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Bacillus cereus]</a>	133	133	68%	9e-34	34%	<a href="#">WP_000586617.1</a>
<a href="#">hydralysin-2 [Bacillus thuringiensis]</a>	133	133	71%	1e-33	33%	<a href="#">WP_086407497.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Bacillus thuringiensis]</a>	133	133	71%	1e-33	33%	<a href="#">WP_000586615.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Bacillus cereus]</a>	133	133	71%	1e-33	33%	<a href="#">WP_000586614.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Bacillus cereus]</a>	133	133	74%	2e-33	32%	<a href="#">WP_016082893.1</a>
<a href="#">hydralysin-2 [Bacillus thuringiensis]</a>	132	132	71%	2e-33	33%	<a href="#">WP_086790671.1</a>
<a href="#">hydralysin-2 [Bacillus thuringiensis]</a>	132	132	71%	3e-33	33%	<a href="#">WP_086398617.1</a>
<a href="#">hydralysin-2 [Bacillus cereus]</a>	132	132	70%	3e-33	34%	<a href="#">WP_078205335.1</a>
<a href="#">MULTISPECIES: hypothetical protein [Bacillus]</a>	131	131	74%	5e-33	32%	<a href="#">WP_043938562.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Bacillus cereus]</a>	131	131	70%	7e-33	34%	<a href="#">WP_061530406.1</a>
<a href="#">hydralysin-2 [Bacillus cereus]</a>	131	131	68%	8e-33	34%	<a href="#">WP_065230018.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Bacillus cereus]</a>	131	131	71%	9e-33	33%	<a href="#">WP_061667036.1</a>
<a href="#">hydralysin-2 [Bacillus cereus]</a>	130	130	68%	1e-32	33%	<a href="#">WP_088346608.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Bacillus bombysepticus]</a>	130	130	68%	1e-32	35%	<a href="#">WP_044585299.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Bacillus cereus]</a>	130	130	70%	1e-32	33%	<a href="#">WP_048564006.1</a>
<a href="#">MULTISPECIES: hydralysin-2 [Bacillus cereus group]</a>	130	130	70%	1e-32	32%	<a href="#">WP_070169500.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Bacillus cereus]</a>	130	130	70%	1e-32	32%	<a href="#">WP_000586618.1</a>

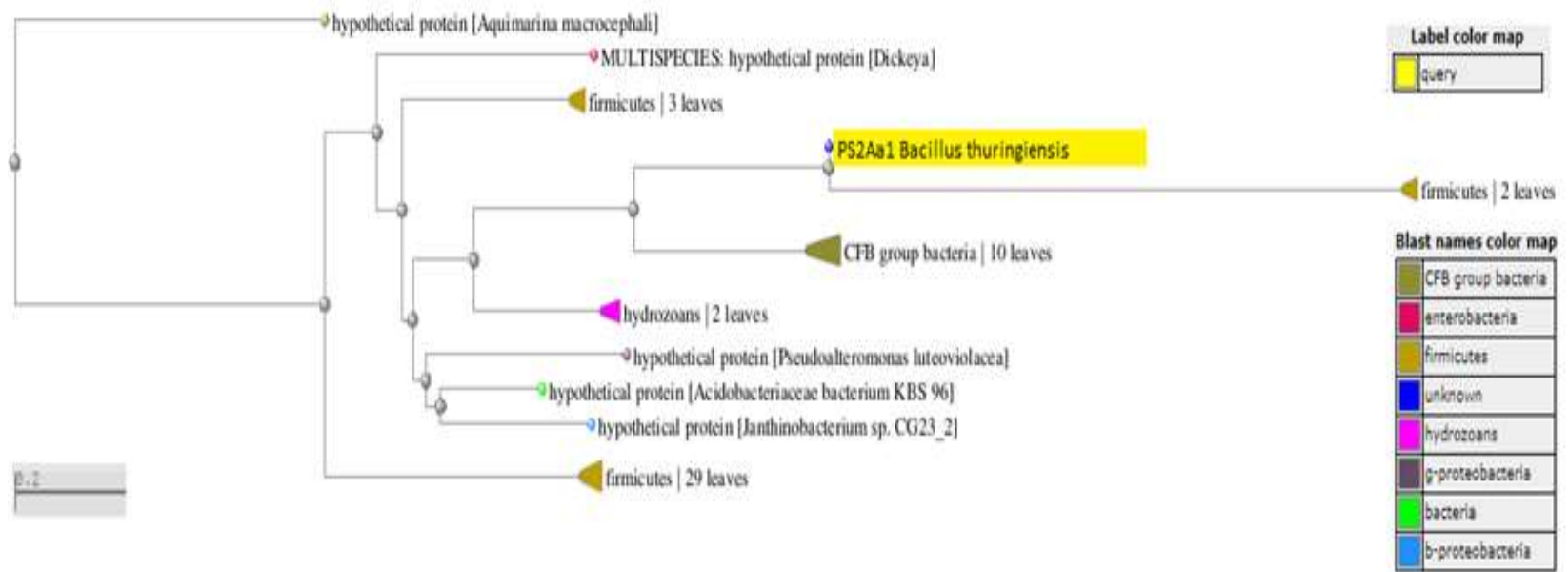


FIGURA 2. Árbol filogenético de la PS2Aa1

## 7.2 Similitud de PS4Aa1 con otras proteínas

El BLAST de la PS4 mostró identidad solo con proteínas hipotéticas de géneros bacterianos como *Bacillus*, *Virgibacillus* o *Nocardia*, a un valor esperado (E-value) significativo o mayor de la línea base (threshold) (Tabla 3). Sin embargo, a un E-value menor de la línea base si se encontró similitud con la toxina ETX mosquitocidal perteneciente a la familia de proteínas MTX2, con citotoxinas leucocidin de *Streptomyces yunnanensis* o con toxinas tipo epsilon-toxin de *Clostridium botulinum* (Tabla 4). Este resultado se debe tomar con reserva, ya que el E-value es un parámetro que básicamente describe la probabilidad de que el resultado se deba por simple aleatoriedad, es decir entre más cercano a 0 sea el E-value, el resultado es más significativo.

**TABLA 3. BLAST de la secuencia aminoacídica de la PS4Aa1 con un valor esperado significativo.**

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">hypothetical protein [Bacillus thuringiensis]</a>	86.7	86.7	90%	1e-16	28%	<a href="#">WP_044798637.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Virgibacillus chiquensis]</a>	85.5	85.5	89%	4e-16	29%	<a href="#">WP_073006288.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Bacillus thuringiensis]</a>	72.4	72.4	64%	4e-11	28%	<a href="#">WP_087989960.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Bacillus thuringiensis]</a>	71.6	71.6	64%	5e-11	28%	<a href="#">WP_088080922.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Virgibacillus chiquensis]</a>	65.1	65.1	64%	8e-09	26%	<a href="#">WP_073008904.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Virgibacillus chiquensis]</a>	63.9	63.9	89%	2e-08	24%	<a href="#">WP_073006284.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Vibrio caribbeanicus]</a>	60.1	60.1	88%	4e-07	26%	<a href="#">WP_009601263.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Nocardia abscessus]</a>	54.7	54.7	70%	2e-05	28%	<a href="#">WP_043701198.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Virgibacillus chiquensis]</a>	54.3	54.3	89%	4e-05	24%	<a href="#">WP_084723762.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Bacillus thuringiensis]</a>	52.8	52.8	63%	1e-04	28%	<a href="#">WP_087876320.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Bacillus thuringiensis]</a>	52.0	52.0	98%	3e-04	23%	<a href="#">WP_000022219.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Paenibacillus elgii]</a>	48.5	48.5	86%	0.003	23%	<a href="#">WP_088832143.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Lysinibacillus sp. AC-3]</a>	48.9	48.9	68%	0.003	28%	<a href="#">WP_079562232.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Paenibacillus tyrfis]</a>	48.5	48.5	86%	0.003	22%	<a href="#">WP_081890361.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Enterococcus sp. 10A9_DIV0425]</a>	48.5	48.5	49%	0.003	34%	<a href="#">WP_086284483.1</a>



**TABLA 4. BLAST de la secuencia aminoacídica de la PS4Aa1 con un valor esperado poco significativo.**

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">toxin ETX [Brevibacillus sp. SKDU10]</a>	48.1	48.1	46%	0.006	33%	<a href="#">WP_064019383.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Bacillus mycoides]</a>	47.4	47.4	81%	0.007	27%	<a href="#">WP_085313412.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Streptococcus oralis]</a>	46.6	46.6	26%	0.009	35%	<a href="#">WP_063645785.1</a>
<a href="#">epsilon toxin ETX/mosquitocidal toxin MTX2 family protein [Brevibacillus laterosporus]</a>	47.4	47.4	48%	0.009	32%	<a href="#">WP_023584803.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Bacillus thuringiensis]</a>	47.0	47.0	28%	0.011	36%	<a href="#">WP_088405059.1</a>
<a href="#">MULTISPECIES: hypothetical protein [Bacillus cereus group]</a>	46.6	46.6	68%	0.015	25%	<a href="#">WP_000983933.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Bacillus thuringiensis]</a>	46.2	46.2	60%	0.020	27%	<a href="#">WP_080548882.1</a>
<a href="#">toxin ETX [Brevibacillus laterosporus]</a>	45.8	45.8	46%	0.027	32%	<a href="#">WP_003343878.1</a>
<a href="#">toxin ETX [Brevibacillus laterosporus]</a>	45.8	45.8	46%	0.028	32%	<a href="#">WP_003335738.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Enterococcus mundtii]</a>	45.1	45.1	39%	0.053	33%	<a href="#">WP_088334847.1</a>
<a href="#">mosquitocidal toxin [Paenibacillus alvei]</a>	45.1	45.1	61%	0.063	28%	<a href="#">WP_005445285.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Enterococcus mundtii]</a>	44.7	44.7	39%	0.077	33%	<a href="#">WP_071887270.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Enterococcus mundtii]</a>	44.3	44.3	49%	0.080	31%	<a href="#">WP_077181343.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Enterococcus mundtii]</a>	44.3	44.3	39%	0.083	33%	<a href="#">WP_074798803.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Bacillus thuringiensis]</a>	44.3	44.3	89%	0.085	23%	<a href="#">WP_087878319.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Enterococcus pernyi]</a>	44.3	44.3	49%	0.088	31%	<a href="#">WP_082805258.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Lactococcus lactis]</a>	43.9	43.9	40%	0.11	32%	<a href="#">WP_058211732.1</a>
<a href="#">pesticidal protein [Bacillus thuringiensis]</a>	43.9	43.9	52%	0.11	21%	<a href="#">WP_088403833.1</a>
<a href="#">MULTISPECIES: hypothetical protein [Bacillus]</a>	43.9	43.9	52%	0.12	21%	<a href="#">WP_000408478.1</a>
<a href="#">toxin ETX [Brevibacillus laterosporus]</a>	43.9	43.9	48%	0.12	34%	<a href="#">WP_031415040.1</a>
<a href="#">cytotoxin leucocidin [Streptomyces yunnanensis]</a>	43.9	43.9	89%	0.13	22%	<a href="#">WP_073445788.1</a>
<a href="#">cytotoxin leucocidin [Streptomyces sp. NBRC 110611]</a>	43.9	43.9	66%	0.13	26%	<a href="#">WP_085939357.1</a>
<a href="#">cytotoxin Leucocidin [Streptomyces albulus]</a>	43.9	43.9	89%	0.13	22%	<a href="#">WP_016577252.1</a>
<a href="#">cytotoxin leucocidin [Streptomyces albulus]</a>	43.9	43.9	89%	0.14	22%	<a href="#">WP_037883010.1</a>
<a href="#">hypothetical protein [Enterococcus mundtii]</a>	43.1	43.1	49%	0.19	31%	<a href="#">WP_023519828.1</a>

Por otra parte, en el PSI-BLAST de la PS4Aa1 sí se encontró un dominio perteneciente a la superfamilia de toxinas ETX-MX2 (no. Pfam 03318). Esta familia de toxinas está representada por la toxina épsilon de *Clostridium perfringens* que es una toxina responsable de la enterotoxemia en animales, principalmente ovejas o la toxina de 31.8 kDa de *Bacillus sphaericus* con actividad mosquitocida. En la figura 3 se muestra el alineamiento de la secuencia de la PS4Aa1 con secuencias de referencia pertenecientes a la superfamilia de toxinas ETX-MTX2, como las ETX de *Brevibacillus sp.*, la citotoxina leucocidina de *Streptomyces yunnanensis* o la toxina épsilon de *Clostridium botulinum*. En la figura 4 se muestra el árbol filogenético de estas mismas secuencias analizadas con el PSI-BLAST.

```

BAD22577      1  M  AIIH-----LANEL-AIH--AKRHCAARGYTYLV  27
WP_064018362  1  M  KKFASLILISVFLFSSTQFVHASSTDVQERLRDLAREDEAGTLNEAMNTHFKPSDEQQ-----FSYSPTEGIVF  70
WP_085313412  1  M  -IIN-----FDDVRSVH--HQTF-----17
WP_022584503  1  M  KKFASLILISVFLFSSTQFVHASSTDVQERLRDLARENEAGTLNVAWNTNFKPSDEQQ-----FSYSPTEGIVF  70
WP_031415040  1  M  KKFASLILISVFLFSSTQFVHASSTDVQERLRDLARENEAGTLNEAMNTHFKPSDEQQ-----FSYSPTEGIVF  70
WP_073445788  1  M[5]RRILAAVPVAGLAAAVPVSLLTAGAAVAAPGRPNAPQAAPRKAARSLQEITDEWGC--HvaRERFPGSNGCRFTA  81
WP_013721059  1  M  IK-----NIADaYK11PSVFCQSKNCEI  26

BAD22577      28  SGLQAHTGNYGRIYNYN--MS---VPDPVTDNPTAAAHARGTTP--NPTSQPIIRTIISFHETLDSQSTA  TEH  94
WP_064018362  71  LTPPKNVIGERRISQYK---VNMAMATLEGSPTESVGTPLYAGKNVLDNSKGTGTHQQLLTPEFNYTYTESTSHT  TTH  144
WP_085313412  18  ---SHSPFLRVFNYD---ISHPVIIPKSVEDLP-DLTLRSSVQILENNSHPQTKSLNLDTTDTSSSTA[6]TTT  92
WP_022584503  71  LTPPKNVIGERRISQYK---VNMAMATLEGSPTESVGTPLYAGKNVLDNSKGTGTHQQLLTPEFNYTYTESTSHT  TTH  144
WP_031415040  71  LTPPKNVIGERRISQYK---VNMAMATLEGSPTESVGTPLYAGKNVLDNSKGTGTHQQLLTPEFNYTYTESTSHT  TTH  144
WP_073445788  82  STDYGRGELGDYHKYQv-----STKYTGITYDPHAPSPIPGQV--SSVTNHYRNGSSVQETVYKQSKTTE[6]VTE  155
WP_013721059  27  EGSDSRVEDELNRGKYNFd1IQSGLKPIGQPTIKNITHVQNTRLINET-SLOQTMREIFSRRETFQSTK  TIL  102

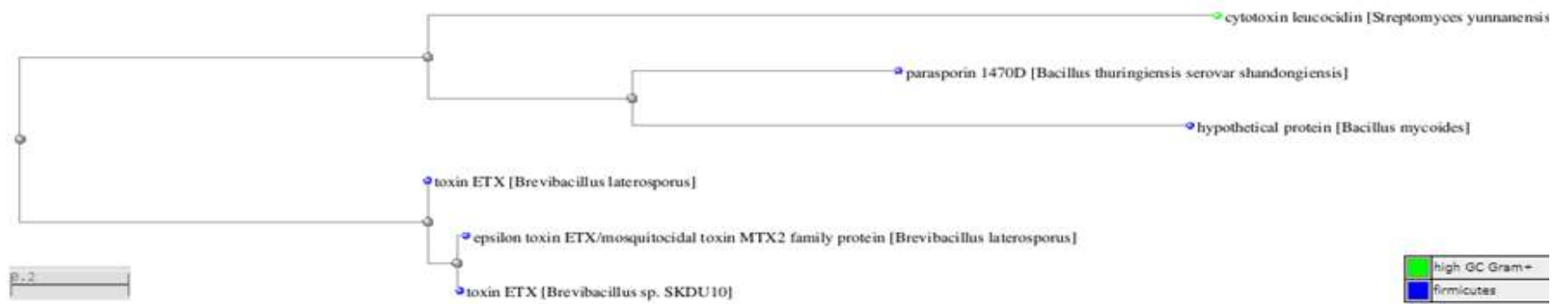
BAD22577      95  GITAGAEVTVKSEAGLIFAkvgFEVKVFSQNYTNTNTYTTETSRSWTD-SLQITVPPGYVTEHTFIVQGTGPKYKVVLE  173
WP_031415040  145  GLKLGKYTATMKFP1AQG---SMEASTEYMFQDSSDSTTKTVSYKSPSQIKVPAKTFRVLAVLINTGSISEGANLY  220
WP_073445788  156  SLKIGVSHVSAEIPAVAK---VSETTSIETHLSSTQEYTHKETQHWV-DLPLKIPAKSAIEASLVIGTKYDIDMTAT  231
WP_013721059  103  GPNIGIKASGKFTAKFLSgveTSIEVSAQFNLSDQTTTKSETVFTIIPSQOILVPSKSIKVTALFNKVCSCNGKVLQ  182

BAD22577      174  ADIAGHG--WFN  YSA---PGYTGTIVNITQVLVONKVPVTPYP-----DNFYARfrGSGL-[1]GKMGQLQSF  235
WP_064018362  221  ANVGGIA--W--  ---RVSPGYPHGGVNIIGAVLTKCQKQGWGDFRNFQPSGRDVIK--GQGTFK  SHYGTDFI  284
WP_085313412  170  ADITGDP----N  AYD---EYLVSGPYLIAAGKYWNEI-GAIPISNPSGKMDNRYRAtdQHGIIV[8]VVOYGLYST  242
WP_022584503  221  ANVGGIA--W--  ---GVLPGYPHGGIINIIGAVLTKCQKQGWGDFRNFQPSGRDVIK--GQGTFK  SHYGTDFI  284
WP_031415040  221  ANVGGIA--W--  ---GVLPGYPHGGVNIIGAVLTKCQKQGWGDFRNFQPSGRDVIK--GQGTFK  SHYGTDFI  284
WP_073445788  232  VSMAGAVaIhFN[5]NHD----GOYHhLhFVPIEEVFRDCRTHSITDTGVEITGDGVHAF--ASGKFG  GGQGVAVN  304
WP_013721059  183  TTVRgyD--YId[5]VPNpGGHPCVSGTEKVPFGKLARMANSDFVPPVAN---SDTEMTIM--GIGEYS  TDTATNFH  254

BAD22577      236  VNLVERPLLGRAGQVRE[4]VSLPSGLDIPIfdPVVSLQ-  275
WP_064018362  285  LKIE--DITDSKLANW  GSGTVVQEIKV--PLIRTEI  317
WP_085313412  243  VRIDETPIYANEGESRT[4]PKY-----ISSN-  270
WP_022584503  285  LKIE--DITDSKLANW  GSGTVVQEIKV--PLIRTEI  317
WP_031415040  285  LKIE--DITDSKLANW  GSGTVVQEIKV--PLIRTEI  317
WP_073445788  305  VVVVQKDLQGRTRKRNAP[1]-SLLVPLQQG--kKVIRSGR  340
WP_013721059  255  LNIeQLDLNGKLIxSN  -SYVIKPIIKVIdEKVITE-  289

```

**FIGURA 3. Alineamiento múltiple de la PS4Aa1 con toxinas de la superfamilia ETX-MTX2**



**FIGURA 4. Árbol filogenético de a PSA4a1 con diferentes toxinas de las superfamilia ETX-MTX2**

### **7.3 Propiedades físico-químicas de las PS2Aa1 y PS4Aa1**

Las principales propiedades físicas y químicas de las protoxinas y toxinas se resumen en la tabla 5. En donde en primer lugar, llama la atención el punto isoeléctrico teórico que es similar para las protoxinas de PS2Aa1 y PS4Aa1 así como la fracción tóxica de PS2Aa1, con un pH ácido; mientras que la fracción tóxica de la PS4Aa1 tiene un pI un poco mayor, muy cercano a la neutralidad. Este es un punto importante a considerar en los bioensayos, ya que los medios de cultivo celular tienen un pH de 7.0- 7.4, que al ser tan cercano al pI de la toxina pudiera disminuir la solubilidad de la misma.

Los coeficientes de extinción molar son útiles al momento de cuantificar las proteínas, usando las lecturas de absorbancia a OD280nm. En el caso de la pro-toxina de PS2Aa1, se recomienda usar el coeficiente de 33350, ya que teóricamente la secuencia de la proteína no contiene puentes di-sulfuro entre cisteínas.

#### **7.3.1 Parámetros relacionados a la estabilidad y solubilidad de las proteínas**

Un punto interesante que considerar es la vida media estimada, que es una predicción que toma el tiempo en el cual la mitad de las moléculas se degradan dentro de la célula después de ser sintetizadas. ProtParam arroja la estimación para tres organismos modelos, en donde las toxinas de PS2Aa1 y PS4Aa1 tienen una vida media estimada en mamíferos, específicamente reticulocitos humanos, mucho menor al de sus protoxinas. Esto se explica, ya que la vida media está determinada por la “regla del extremo N-terminal”, que se relaciona con la identidad de los residuos hacia el N-terminal (Varshavsky, 1997). Al parecer, la activación de las dos parasporinas deja extremos N-terminales que son más susceptibles de ubiquitinación, la cual es una señal celular para la degradación de proteínas (Lecker, Goldberg, & Mitch, 2006).

**TABLA 5. Propiedades físicas y químicas de la PS2Aa1**

	<b>Pro-PS2Aa1</b>	<b>PS2Aa1 tóxica</b>	<b>Pro-PS4Aa1</b>	<b>PS4Aa1 tóxica</b>
<b>No. De residuos</b>	338 aa	225 aa	275 aa	245 aa
<b>Peso molecular</b>	37447.66	27857.02	30079.88	26828.09
<b>pI</b>	5.35	5.93	6.09	7.12
<b>Fórmula</b>	C <sub>1649</sub> H <sub>2542</sub> N <sub>438</sub> O <sub>535</sub> S <sub>12</sub>	C <sub>1240</sub> H <sub>1930</sub> N <sub>324</sub> O <sub>401</sub> S <sub>2</sub>	C <sub>1355</sub> H <sub>2082</sub> N <sub>356</sub> O <sub>410</sub> S <sub>5</sub>	C <sub>1206</sub> H <sub>1846</sub> N <sub>320</sub> O <sub>367</sub> S <sub>4</sub>
<b>Átomos</b>	5176	3897	4208	3743
<b>Coefficiente de extinción</b>	33725* 33350**	20400	45840	44350
<b>Vida media estimada</b>	30 h mamíferos ( <i>in vitro</i> ) >20 h levaduras ( <i>in vivo</i> ) >10 h <i>E. coli</i> ( <i>in vivo</i> )	1.1 h mamíferos ( <i>in vitro</i> ) 3 min h levaduras ( <i>in vivo</i> ) >10 h <i>E. coli</i> ( <i>in vivo</i> )	30 h mamíferos ( <i>in vitro</i> ) >20 h levaduras ( <i>in vivo</i> ) >10 h <i>E. coli</i> ( <i>in vivo</i> )	4.4 h mamíferos ( <i>in vitro</i> ) >20 h levaduras ( <i>in vivo</i> ) >10 h <i>E. coli</i> ( <i>in vivo</i> )
<b>Índice de inestabilidad</b>	34.26	29.14	29.03	26.42
<b>Índice alifático</b>	63.11	72.20	81.16	76.41
<b>Hidropatía (GRAVY)</b>	-0.433	-0.252	-0.171	-0.240
<b>Composición de aminoácidos</b>	Ala (A) 14 4.1% Arg (R) 12 3.6% Asn (N) 24 7.1% Asp (D) 14 4.1% Cys (C) 6 1.8% Gln (Q) 18 5.3% Glu (E) 17 5.0% Gly (G) 22 6.5% His (H) 3 0.9% Ile (I) 18 5.3% Leu (L) 16 4.7% Lys (K) 14 4.1% Met (M) 6 1.8% Phe (F) 19 5.6% Pro (P) 18 5.3% Ser (S) 31 9.2% Thr (T) 46 13.6% Trp (W) 2 0.6% Tyr (Y) 15 4.4% Val (V) 23 6.8% Pyl (O) 0 0.0% Sec (U) 0 0.0%	Ala (A) 13 5.1% Arg (R) 10 3.9% Asn (N) 17 6.7% Asp (D) 9 3.5% Cys (C) 1 0.4% Gln (Q) 9 3.5% Glu (E) 12 4.7% Gly (G) 16 6.3% His (H) 1 0.4% Ile (I) 16 6.3% Leu (L) 13 5.1% Lys (K) 10 3.9% Met (M) 1 0.4% Phe (F) 16 6.3% Pro (P) 13 5.1% Ser (S) 26 10.2% Thr (T) 41 16.1% Trp (W) 1 0.4% Tyr (Y) 10 3.9% Val (V) 20 7.8% Pyl (O) 0 0.0% Sec (U) 0 0.0%	Ala (A) 20 7.3% Arg (R) 11 4.0% Asn (N) 17 6.2% Asp (D) 9 3.3% Cys (C) 1 0.4% Gln (Q) 11 4.0% Glu (E) 12 4.4% Gly (G) 24 8.7% His (H) 4 1.5% Ile (I) 18 6.5% Leu (L) 17 6.2% Lys (K) 8 2.9% Met (M) 4 1.5% Phe (F) 10 3.6% Pro (P) 18 6.5% Ser (S) 18 6.5% Thr (T) 30 10.9% Trp (W) 4 1.5% Tyr (Y) 16 5.8% Val (V) 23 8.4% Pyl (O) 0 0.0% Sec (U) 0 0.0%	Ala (A) 19 7.8% Arg (R) 10 4.1% Asn (N) 17 6.9% Asp (D) 7 2.9% Cys (C) 1 0.4% Gln (Q) 8 3.3% Glu (E) 11 4.5% Gly (G) 22 9.0% His (H) 4 1.6% Ile (I) 15 6.1% Leu (L) 14 5.7% Lys (K) 8 3.3% Met (M) 3 1.2% Phe (F) 9 3.7% Pro (P) 14 5.7% Ser (S) 15 6.1% Thr (T) 30 12.2% Trp (W) 4 1.6% Tyr (Y) 15 6.1% Val (V) 19 7.8% Pyl (O) 0 0.0% Sec (U) 0 0.0%

\*Coeficiente de extinción suponiendo que todos los pares de residuos de Cys forman cistinas

\*\*Coeficiente de extinción suponiendo que todos los residuos de Cys se reducen

Por otra parte, los índices de estabilidad (II) son otro punto importante que considerar, ya que es un estimado de la estabilidad de una proteína en tubo de ensayo. Este se estima con la ocurrencia de ciertos dipéptidos en la secuencia aminoacídica (Guruprasad, Reddy, & Pandit, 1990). Un índice de estabilidad mayor a 40 está relacionado a proteínas inestables en tubo de ensayo. En nuestro caso, las cuatro secuencias mostraron índices menores a 35, lo cual se puede considerar como aceptables.

De igual manera, los índices alifáticos de nuestras secuencias fueron aceptables (>70). El índice alifático puede considerarse como un factor positivo para el aumento de la termo estabilidad de las proteínas; en donde aquellas provenientes de organismos termófilos, tienen índices más altos (Ikai, 1980). De igual forma, junto al índice de estabilidad, esto puede ser un indicio de la solubilidad de las proteínas sobre expresadas en sistemas heterólogos (Idicula-thomas & Balaji, 2005).

El número GRAVY determina la hidrofobicidad o hidrofiliidad de una proteína. La hidropatía se mide en un rango entre -2 y +2 para la mayoría de las proteínas, en donde los valores positivos están más relacionados con comportamientos hidrofóbicos (Kyte & Doolittle, 1982). Curiosamente, nuestras secuencias muestran valores hidrofílicos, lo cual puede ser favorable en el paso de solubilización. Sin embargo, en el plegamiento de la proteína, los residuos hidrofílicos pudieran no estar tan accesibles y la solubilidad de la proteína decaería.

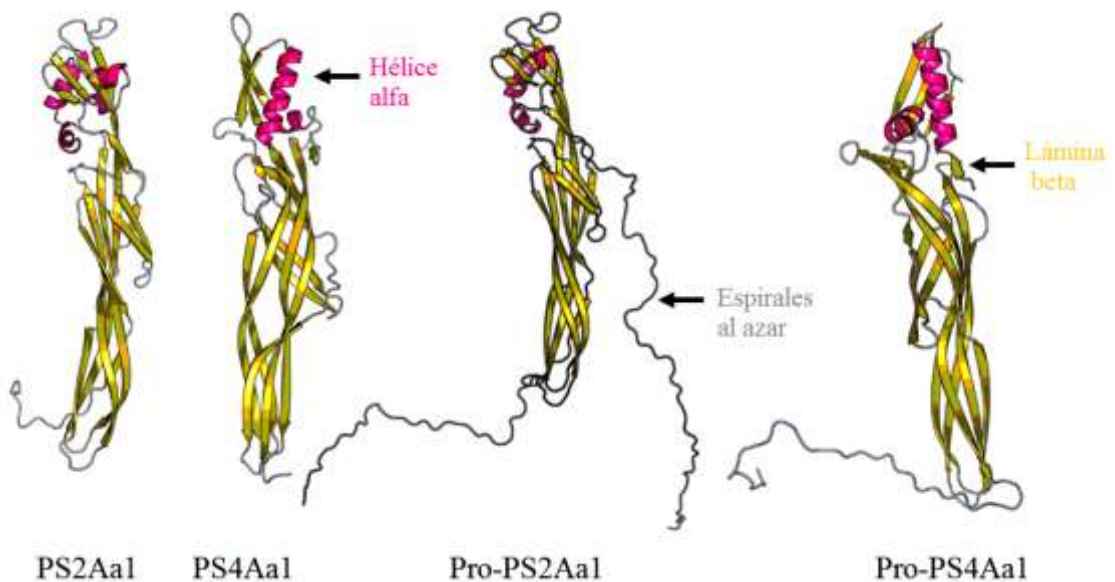
## **7.4 Deducción de los dominios estructurales de las Parasporinas 2 y 4**

### **7.4.1 Estructura tridimensional de las protoxinas**

En primer lugar, se hizo la predicción de la estructura terciaria de las dos parasporinas en forma inactiva o como protoxina. Tanto el programa Raptor como Seis Modelo hicieron una predicción muy similar para las dos protoxinas, tomando como mejor templado para las predicciones las estructuras de la PS2Aa1 activa (PDB ID: 2ZTBA) y la PS4Aa1 activa (PDB ID: 2D42A). Cabe mencionar que los templados con mejor cobertura, después de las mencionadas, fueron la Pro-Aerolisina para la PS2 y la toxina

Épsilon para la PS4. La similitud estructural entre estas toxinas y nuestras biomoléculas será descrita más a detalle en la siguiente sección.

Los modelos y archivos PDB con lo que finalmente se decidió trabajar, fueron los predichos con RaptorX, con el que se logró un modelamiento con una cobertura del 100% en contraste con las del Swiss Model del 74 y 89%. Esto se debe a que la plataforma del RaptorX toma en cuenta los aminoácidos que no se alinean a las estructuras secundarias del templado y, aunque no se logra un buen modelamiento de estas zonas (extremos N y C-terminal de las protoxinas), si las muestra como espirales al azar o coils (Fig. 5). Los modelos predichos con Swiss Model simplemente se omiten estos extremos sin alinear de la estructura que arroja, quedando prácticamente igual al de su templado, en el mejor de los casos.



**Figura 5. Predicción de las estructuras cristalográficas de las protoxinas**

## 7.5 Alineamientos estructurales

Para sustentar experimentalmente la designación de los Dominios, primero se hizo un búsqueda de dominios conservados en la secuencia con la base de datos del PFAM, la cual coincidió con el BLAST hecho en la primera parte del estudio, ya que se identificó un dominio conservado perteneciente a la superfamilia de toxina épsilon de *Clostridium* ETX/MTX2 toxina mosquitocida de *Bacillus* (Thanabalu & Porter, 1996), como se ejemplifica en la figura 6. Algunas de las  $\beta$ -TFP bien caracterizadas, pertenecientes a esta familia, tuvieron una alta similitud a la estructura de las dos Parasporinas. Las dos parasporinas tuvieron alta similitud estructural con otras proteínas de *Bacillus thuringiensis* como la Cry23Aa1 y Cry51Aa1, que si poseen actividad insecticida, forman poros de membrana y no poseen la estructura típica de 3 Dominios de las proteínas Cry (Palma et al., 2014; Xu et al., 2015) como se describe en la tabla 6.

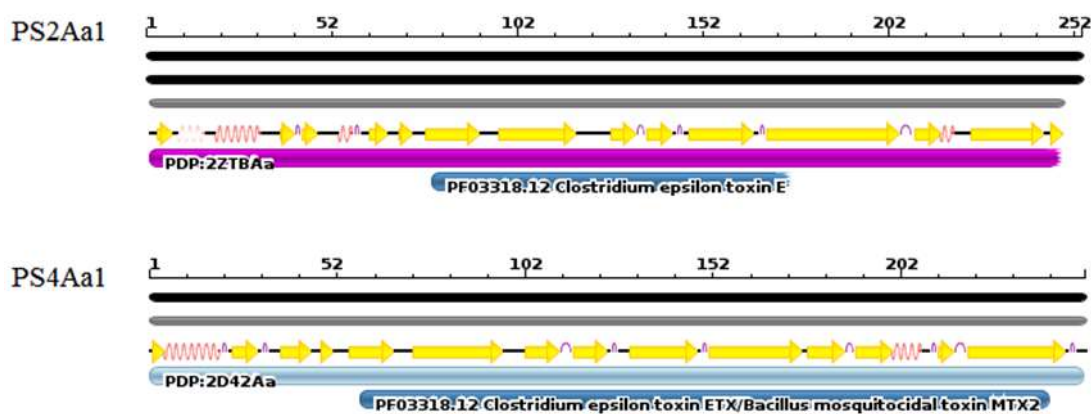
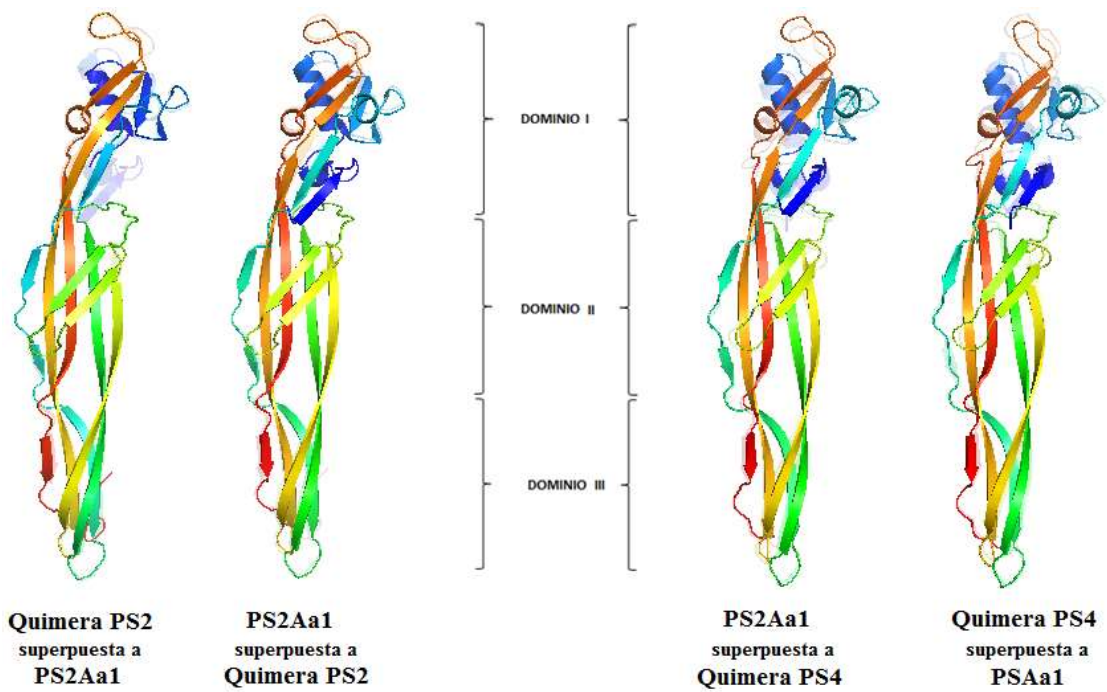


Figura 6. Dominio PFAM conservado en las estructuras terciarias

Interesantemente, todas las proteínas que tuvieron relación estructural con las PS2Aa1 y PS4Aa1 son formadoras de poro, aunque algunas de ellas no son de origen bacteriano. Por ejemplo, la 5DI0Ab es una toxina tipo aerolisina aislada del caballito de mar *Danio reiro* (Jia et al., 2015), la 1W3FAB pertenece al hongo parasítico *Laetiporus*



*sulphureus* (Mancheño, Tateno, Goldstein, Martínez-Ripoll, & Hermoso, 2005) o la 3ZX7Aa es una toxina de la lombriz roja *Eisenia fétida* (Bokori-Brown et al., 2016). Estos resultados *in silico* sustentan la predicción de la estructura. Figura 7



**Figura 7. Alineamiento estructural de las Quimeras con la PS2Aa1 Y PS4Aa1**

**TABLA 6. Similitud estructural de las parasporinas con otras proteínas cristalizadas**

PS2Aa1					
PDB ID	Proteína	Valor p	Score	% Id.	% Cov.
4RHZAa	Cry23AA1	4.23E-7	359.57	6	77
3ZJXAa	EPSILON-TOXIN	2.25E-6	332.32	11	77
4PKMAa	Cry51Aa1	1.17E-4	295.01	7	87
5DI0Ab	Natterin-like protein	1.5E-4	220.55	10	56
PS4Aa1					
PDB ID	Proteína	Valor p	Score	% Id.	% Cov.
4RHZAa	Cry23AA1	1.14E-11	551.08	22	96
4PKMAa	Cry51Aa1	2.54E-11	491.26	13	98
3ZJXAa	EPSILON-TOXIN	3.68E-09	434.61	12	85
5DI0Ab	Natterin-like protein	4.71E-07	291.12	8	63
1W3FAb	Hemolytic Lectin from <i>Laetiporus sulphureus</i>	1.88E-06	263.1	6	61
d3c0na2	Aerolisín/ETX pore-forming domain	6.31E-04	292.52	6	77
3ZX7Aa	LYSENIN	3.34E-2	114.67	3	40
2M8XAa	Uncharacterized protein	3.98E-2	118.08	2	35
4MKMAa	Putative surface anchored protein	4.23E-2	119.48	3	43
4MKMab	Putative surface anchored protein	4.59 E-2	118.84	3	45
2B4HAa	Outer capsid protein VP4	4.71 E-2	161.52	3	42
2WB7Ac	PT26-6P	5.25 E-2	136.18	4	50
3IDUAa	Uncharacterized protein	5.54 E-2	113.31	2	35
3QS2Aa	Fimbrillin matB homolog	5.57 E-2	119.12	34	49

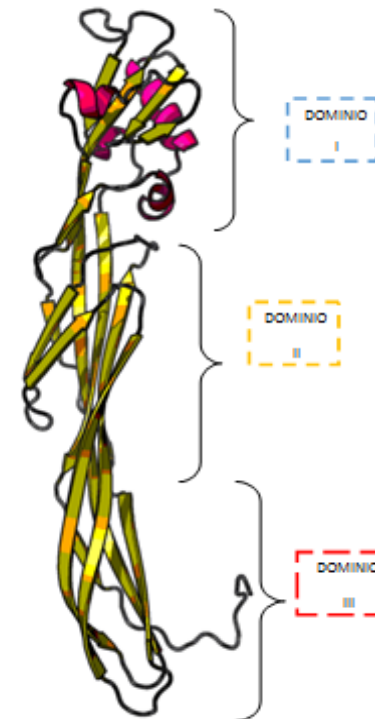
## 7.6 Anotación de los dominios estructurales

Con base en las estructuras predichas de las protoxinas, las estructuras ya descritas de sus toxinas, y otras  $\beta$ -TFP de referencia encontradas en los alineamientos, se hizo la identificación y anotación de los potenciales dominios estructurales de las dos parasporinas, quedando como se esquematiza en las figuras 8 y 9.

## PS2Aa1

```

M Y N D K R M C S D P Y Q G M N K P H Y
1 atg tat aat gat aaa aga atg tgt tct gat cct tat cag ggt atg aat aaa cct cat tat
  C N C H T Y N N S E I T G G L Q V D L D
61 tgc aat tgt cat acg tat aat aat agt gaa ata acc gga ggg ctt gaa gta gat cta gat
  N Q V V E T F Q S T T D V I R E Y L M F
121 aat caa gta gtg gaa aca ttt caa tcc aat aca gac gtt att cga gaa tat ctt atg ttt
  N E L S A L S S S P E S V R S R I S S I
181 aat gag tta tca gca tta agt tca agt cca gaa agt gta aga tct aga ttt tcc tct att
  V G T N P D G I A L N N E T Y F N A V K
241 cat ggt act aat ccc gat ggt att gca tta aat aat gaa aag tat ttt aac gcc gta aaa
  P P F T A Q Y G Y Y C Y K N V G T V Q Y
301 ccg cct att act gct caa tat gga tac tat tgc tat aaa aat gtt ggg act gtt cag tac
  V N R P I D I N P N V I L A Q D T L T N
361 gta aat aga cct act gat att aac cca aac ggt att ctt gnt cca gac aga tta aca aat
  N T N E P F T T T I T I T G S F T N T S
421 aat act aat gaa cca ttt act aca act aac act ata act ggg tct ttt acc aac aag tct
  T V T S S T T T G F K F T S K L S I K K
481 act gtg aca tct agt aca aca aca ggc ttt aca ttt act agt aca cta tca att aaa aaa
  V E E I G G E V S F S T T I G T S E T T
541 gtc ttt gaa att ggt gga gaa gtt tca ttc tct act aca ttt gga aca tct gaa aca act
  T E T I T V S K S V T V T V P A Q S R R
601 aca gaa aca att act gta tct aca tcc gtt aag gtt aag gtt cca gct caa agt aga aga
  T I Q L T A K I A K E S A D F S A P I T
661 act att cag tta aca gct aca ata gca aca gaa tct gca gac ttt agt gct cct att act
  V D G Y F G A N F P K R V G P G G H Y F
721 gtc gat ggt tat ttt ggt gct aat ttt ccc aaa aga gta ggg cca ggt ggg cat tat ttt
  W F N P A R D V L N T T S G T L R G T V
781 tgg ttt aac tcc gct agg gat gtt cta aat act acc tct ggt aca ctt aga ggt aca gtg
  T N V S S F D P Q T I V Q P A R S L L D
841 aag aat gpa tct agt ttt gac ttc caa act ata gtg caa cca gca cgc agt tta cta gat
  E Q Q E T L E Y A I P G D P S G E Q L Q
901 gaa caa caa gaa act tta gaa tat gcc ata cct gga gat cct tct ggg gaa caa ttg cag
  Q M E Q R M F F S K C Q C P K W G N
961 caa atg gaa caa agg atg ttt ttt tcc aaa tgc caa tgc cca aaa tgg ggg aat tag
  
```



Residuos eliminados durante la activación

Láminas Beta

Hélices alfa

Loops

HORQUILLA BETA ANFIPÁTICA

338 AA  
1017 NT

Figura 8. Anotación de Dominios estructurales en la secuencia de la PS2Aa1

PS4Aa1

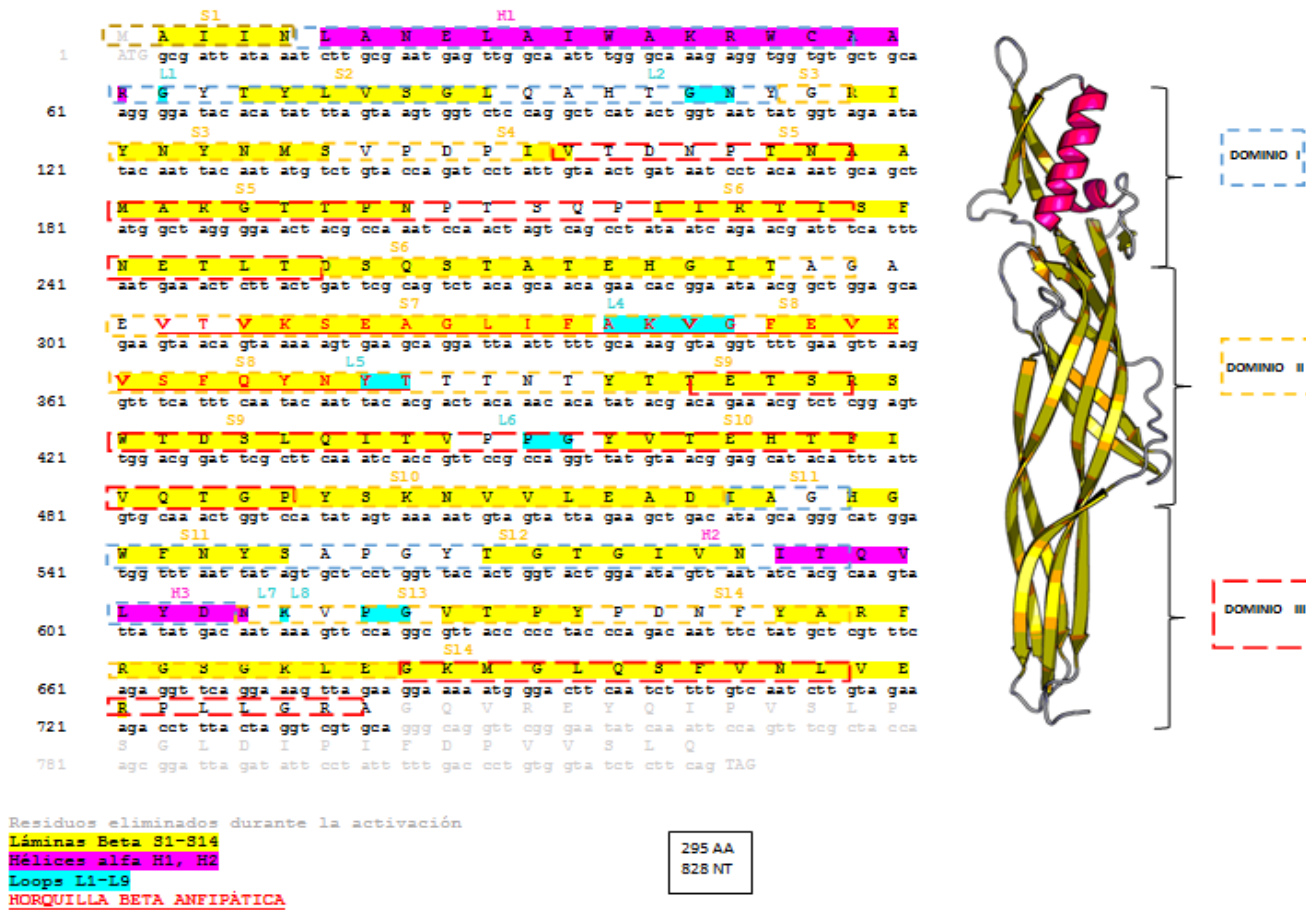
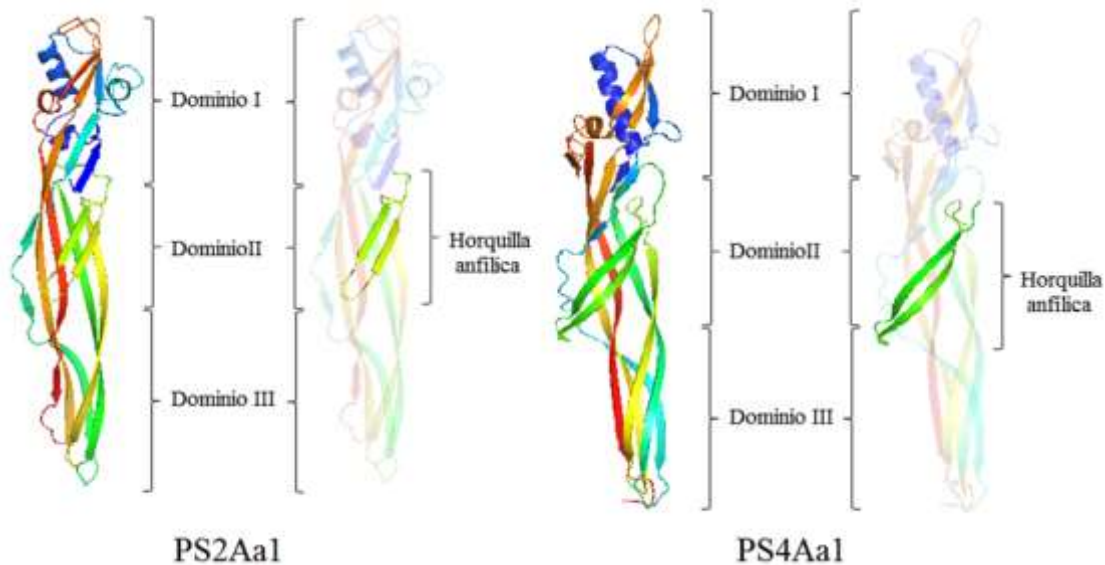


Figura 9. Anotación de Dominios estructurales en la secuencia de la PS4Aa1



**Figura 10. Identificación de dominios estructurales de PS2Aa1 y PS4Aa1**

Las dos moléculas pueden ser divididas en 3 dominios estructurales y potencialmente funcionales (Fig. 8 y 9). El Dominio I, es el único que está compuesto por hélices alfa; dos en el caso de la PS4 y cuatro para la PS2. Este dominio, rico en aminoácidos aromáticos, generalmente se describe como el responsable del reconocimiento a los receptores de membrana, y por lo tanto resulta el más variable a lo largo de las  $\beta$ -TFP's. Los Dominios II y III están compuestos únicamente por láminas beta antiparalelas, las cuales forman una estructura de Sándwich Beta. El motivo estructural clave para la delimitación del Dominio II es la pequeña horquilla formada por dos láminas beta antiparalelas al centro de la molécula. (Fig. 10), la cual por ser una estructura con superficie anfílica, se cree que participa en la oligomerización y formación del barril  $\beta$  transmembranal, como en el caso del complejo de la  $\alpha$ -hemolisina (Akiba et al., 2004; Gouaux et al., 1997). En lo que respecta al Dominio III, caracteriza por estar constituido principalmente por residuos hidrofóbicos, que al formarse el oligómero quedaría insertado en la célula formando propiamente el poro transmembranal.

## 7.7 Modelamiento de quimeras

### 7.7.1 Intercambio de dominio I

Ya que los Dominios II y III son altamente similares estructuralmente, para el diseño de las quimeras se decidió hacer un intercambio entre los Dominios I de nuestras proteínas. Este Dominio resulta especialmente interesante para el de la actividad biológica, ya que, en teoría, el intercambio del Dominio I entre diferentes  $\beta$ -TFP's, cambiará la especificidad hacia su receptor y por tanto las células blanco de las toxinas.

Para comprobar esto experimentalmente, se hizo un alineamiento estructural entre las PS2Aa1 y la PS4Aa1 (Fig. 11). La cobertura total fue del 84%, con un 21.95% de similitud, un valor de  $p$  del 8.31E-07 y un score del 347.68. La mejor cobertura se logró en el alineamiento correspondiente al Dominio II, después con el Dominio III y finalmente el Dominio I, que como ya se sabía, resulta ser el más variable.

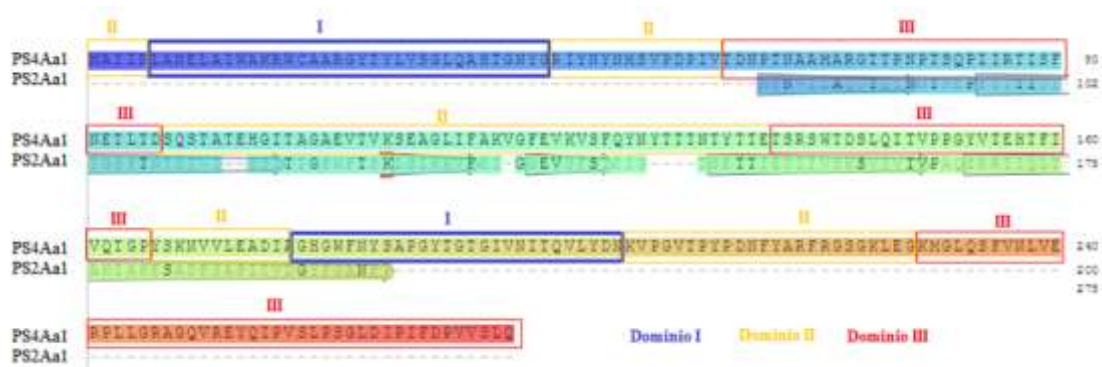
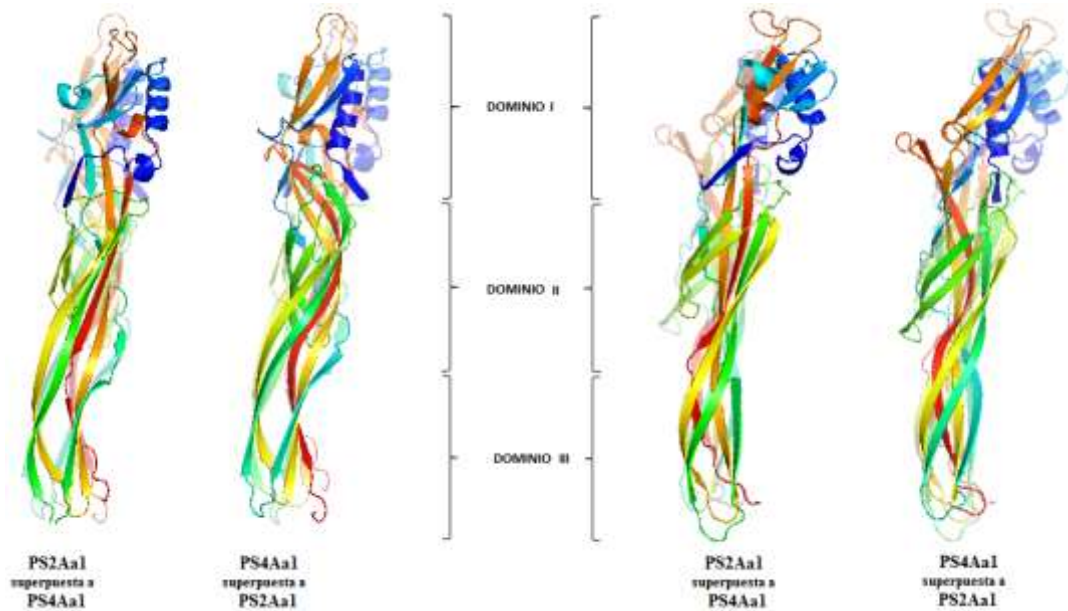


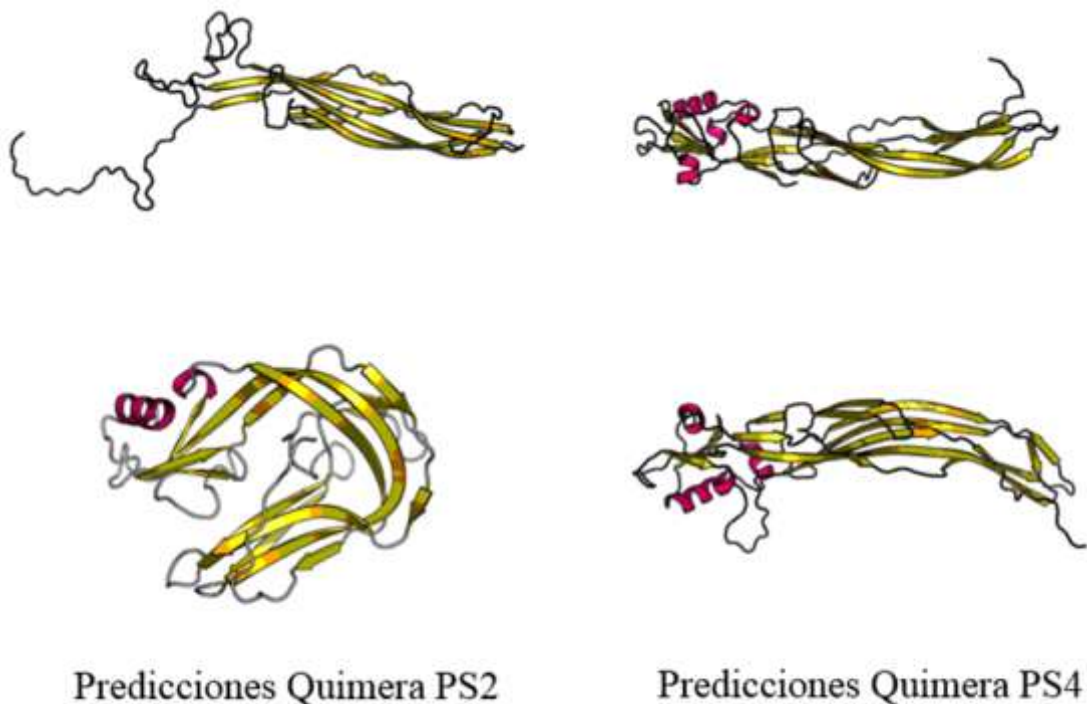
Figura 11. Alineamiento estructural de PS2Aa1 y PS4Aa1

Analizando la primer parte de la secuencia del Dominio I (hacia el extremo N-terminal), encontramos que estructuralmente no tiene relación con ninguna TFP. En el caso del Dominio I de PS2, la mejor similitud (18.42%) se logró con una proteína de replicación repB (PDB ID: 3dkx.1.C) y una proteína de inhibición de la conjugación bacteriana (PDB ID: 1dvo.1.A) con una identidad del 13%. Para el Dominio I de la PS4, no hubo similitud significativa con ninguna estructura conocida.



**Figura 12. Alineamiento estructural de PS2Aa1 y PS4Aa1**

Estos datos nos sugieren un Dominio I altamente variable y poco conservado (Figura 12) , por lo que se decidió hacer el intercambio de este dominio entre las dos parasporinas y se hizo un modelamiento *in silico* para confirmar la formación de estructuras terciarias. Así pues, se tuvo que jugar el intercambio de residuos, ya que al hacer el intercambio estricto del dominio I de la PS2Aa1 con el de la PS4Aa1, las nuevas estructuras formadas no tenían una configuración similar a las toxinas nativas, donde los dominios II y III también pedían su estructura típica. En la figura 13 se muestran algunas de las primeras quimeras hechas.



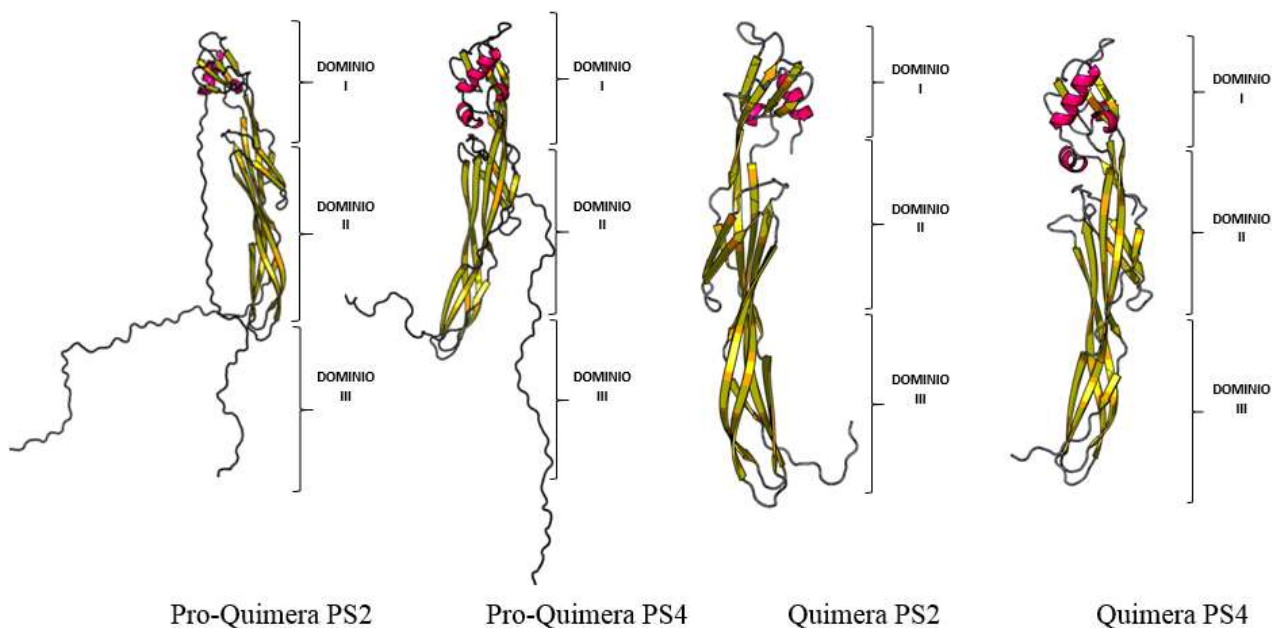
**Figura 13. Predicción estructural de algunas quimeras con intercambio de dominio I**



## 7.8 Quimeras finales

Después de más de una decena de predicciones quiméricas, se encontraron dos quimeras con el menor índice de desorden y una estructura secundaria de Dominios II y III muy similar las toxinas nativas. Las nuevas quimeras se presentan a continuación en la fig. 14, y en la Tabla 7, se resumen las propiedades de las predicciones. También se incluyeron los modelamientos de las dos pro-parasporinas.

Cabe mencionar que para el diseño de la Quimera de PS4 si se tuvieron que hacer algunas modificaciones extra, además del intercambio del Dominio I: en primer lugar, se hizo la sustitución de una metionina por una asparagina en el sitio 29, en el sitio 91 se tuvo que hacer una delección de una asparagina y finalmente, en una de las láminas beta del Dominio II se tuvo que eliminar la secuencia “KVPGVTPYPDFNF”. Todo esto para que el intercambio del Dominio I no desajustara la configuración de las láminas de los Dominios II y III.



**Figura 14. Predicción estructural de las quimeras seleccionadas**

**TABLA 7. Resultado de la predicción de las nuevas parasporinas modeladas**

Proteína	Mejor templado	<i>p</i>	Residuos modelados	Desorden	Hélices $\alpha$	Láminas $\beta$	Espirales al azar
Pro-PS2	2ztbA	4.27e-20	338 (100%)	49 (14%)	8%	50 %	41%
Pro-PS4	2d42A	2.76e-15	275 (100%)	4 (1%)	4%	66%	28%
Pro-Quimera PS2	2ztbA	1.29e-15	316 (100%)	12 (3%)	6%	54%	39%
Pro-Quimera PS4	2ztbA	4.85e-13	333 (100%)	11 (3%)	1%	61%	36%
Quimera PS2	2ztbA	8.16e-15	233(100%)	13(5%)	8%	62%	28%
Quimera PS4	2ztbA	1.32e-15	254(100%)	8(3%)	6%	66%	26%

Para todas las quimeras, las mejores predicciones (con valores de P menor) se obtuvieron con la estructura tóxica de PS2Aa1 como templado (PDB ID: 2ZTBA). Dentro de las predicciones, la quimera de la Parasporina 2 fue la más sencilla de construir, el intercambio del dominio I dejó prácticamente igual la conformación y el orden de las secuencias que conforman los dominios II y III.

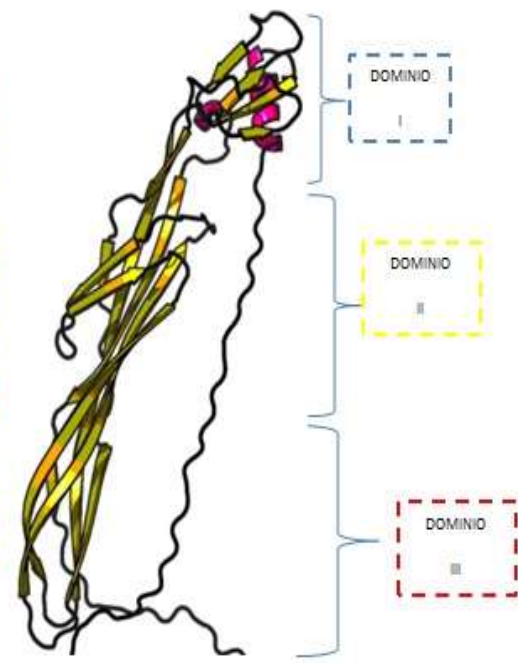
### 7.8.1 Anotación de los dominios estructurales de las quimeras.

Con base a las estructuras de las protoxinas de las PS2 Aa1 y PS4Aa1 ya predichas y descritas, y los moldeamientos *in silico* de las quimeras presentadas con anterioridad, se identificaron y anotaron los posibles dominios estructurales de ambas proteínas, tal y como lo esquematizan las figuras 15 y 16.

QUIMERA PS2

```

M Y N D K R M C S D P Y Q G M N K P H Y
atg tac aac gac aag cgt atg tgc agc gat ccg tat cag ggt atg aac aaa ccg cac tac
C N C H T Y N N S E I T G G L Q V D L D
tgc aac tgc cac acc tat aac aac agc gaa atc acc ggt ggc ctg cag ttg gac ctg gat
N Q V V E I F Q S T E D V I E E Y L A W
aac caa gtg gtt gag acc ttc cag agc acc acc gat gtt atc cgt gaa tac ctg gcg aac
E L A I W A K R W C A A R G Y T Y L V S
Gac ctg gcg att tgg qcg aag cgc tgg tgc qcg gcg cgt ggt tac acc tat ctg qtt aqc
G L Q A H F G N Y G C Y K N V G T V Q Y
Ggc ctg caa gcg cac acc ggt aac tac ggc tgc tat aaa aac gtt ggc acc ttg cag tat
V N R P T D I N P N V I L A Q D T L T N
gth aac cgt ccg aac gaa atc aac ccg aac gtg aat ctg gcg caa gtt acc ctg acc aac
N T N E P F T T I I T I T G S F T N T S
aac acc aac gaa ccg ttc acc acc acc atc acc att acc ggt agc ttt acc aac acc agc
T V T S S I T T G F K F T S K L S I K K
Acc gtt acc agc agc acc acc ggc ttc aag ttt acc agc aaa ctg agc atc aag aaa
V F E I G G E V S E S T T I G T S E T T
Gtr ttc gaa att cgt cgc gag gtt agc ttt acc agc acc atc ggc agc agc gaa acc acc
T E T I T V S K S W T V T V P A Q S R R
Acc gag acc att acc ttg agc aag agc ttg acc gtt acc ttg ccg gcg caa agc Cgt cgt
T I Q L T A K I A K E S A D F S A P I T
Acc atc cag ctg acc gcg aag att gcg aaa gag agc gcg gac ttc agc gcg ccg atc acc
V D G H G W F M Y S A P G Y T G T G I V
gth gat ggt cac ggc agy ttt aac tac agc gcg ccg ggt tat acc ggc acc ggt aac ctg
N I E Q V L Y D N T S G T L R G T V T N
Aac att acc cag gtt ctg tac gac aac acc agc ggc acc ctg cgt ggc acc ttg acc aac
V S S E D F Q I V Q P A R S L L D E Q
Gtt agc agc ttc Gac ttt cag acc atc gtt caa ccg gcg cgt agc ctg ctg gat gag cag
Q E T L E Y A I P G D P S G E Q L Q Q M
Caa gaa acc ctg gag tat gcg att ccg ggt gac ccg agc ggc gaa caa ctg cag caa atg
E Q R M F F S K C Q C P K W G N
gag cag cgt atg ttc ttt agc aag tgc caa tgc ccg aaa tgg ggt aac tag
    
```



Residuos eliminados durante la activación

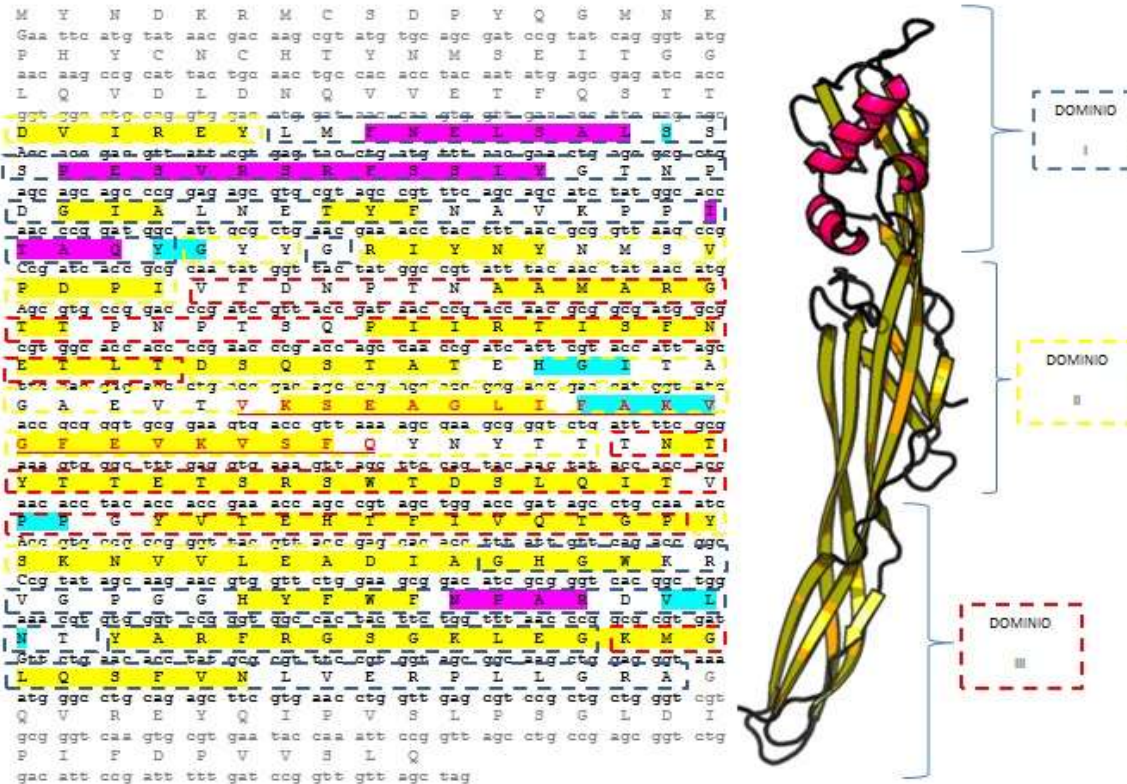
- Láminas Beta
- Hélices alfa
- Loops

300 aa  
903 Nt

HORQUILLA BETA ANFIPÁTICA

Figura 15. Anotación de los dominios estructurales en la secuencia de la Quimera PS2

QUIMERA PS4



Residuos eliminados durante la activación  
**Láminas Beta**  
**Hélices alfa**  
**Loops**  
**HORQUILLA BETA ANFIPÁTICA**

Figura 16. Anotación de los Dominios estructurales en la secuencia de la Quimera PS4

Las dos moléculas fueron también divididas en tres dominios estructurales potencialmente funcionales. En la figura 15 se observa la conformación de la Quimera PS2 en la cual se mantienen las hélices Alfa dentro del Dominio I, la Horquilla anfipática formada por dos laminas Beta antiparalelas dentro del dominio II, que junto con el Dominio III está conformado por laminas Beta antiparalelas. Se presenta la misma conformación de Hélices Alfa en el dominio I, Horquilla Anfipática en el Dominio II y láminas Beta antiparalelas en el Dominio II y III para la Quimera PS4. Figura 16.

### **7.8.2 Alineamientos estructurales**

Para comprobar el correcto plegamiento y conservación de la estructura de los Dominios II y III, se hicieron alineamientos estructurales de las quimeras con las PS2Aa1 y PS4Aa1. En la figura 17 se esquematiza el alineamiento de las quimeras con la PS2Aa1 que sirvió como templado para la predicción de las estructuras terciarias y en la figura 18 el alineamiento tridimensional de las Quimeras con las PS2Aa1 y PS4Aa1. Para las dos quimeras, la superposición con la PS2Aa1 es prácticamente idéntica en las láminas que conforman los dominios II y III; mientras que con la PS4Aa1 si hay marcadas diferencias a lo largo de las estructuras, debido a que la PS2Aa1 sirvió de templado para las predicciones.

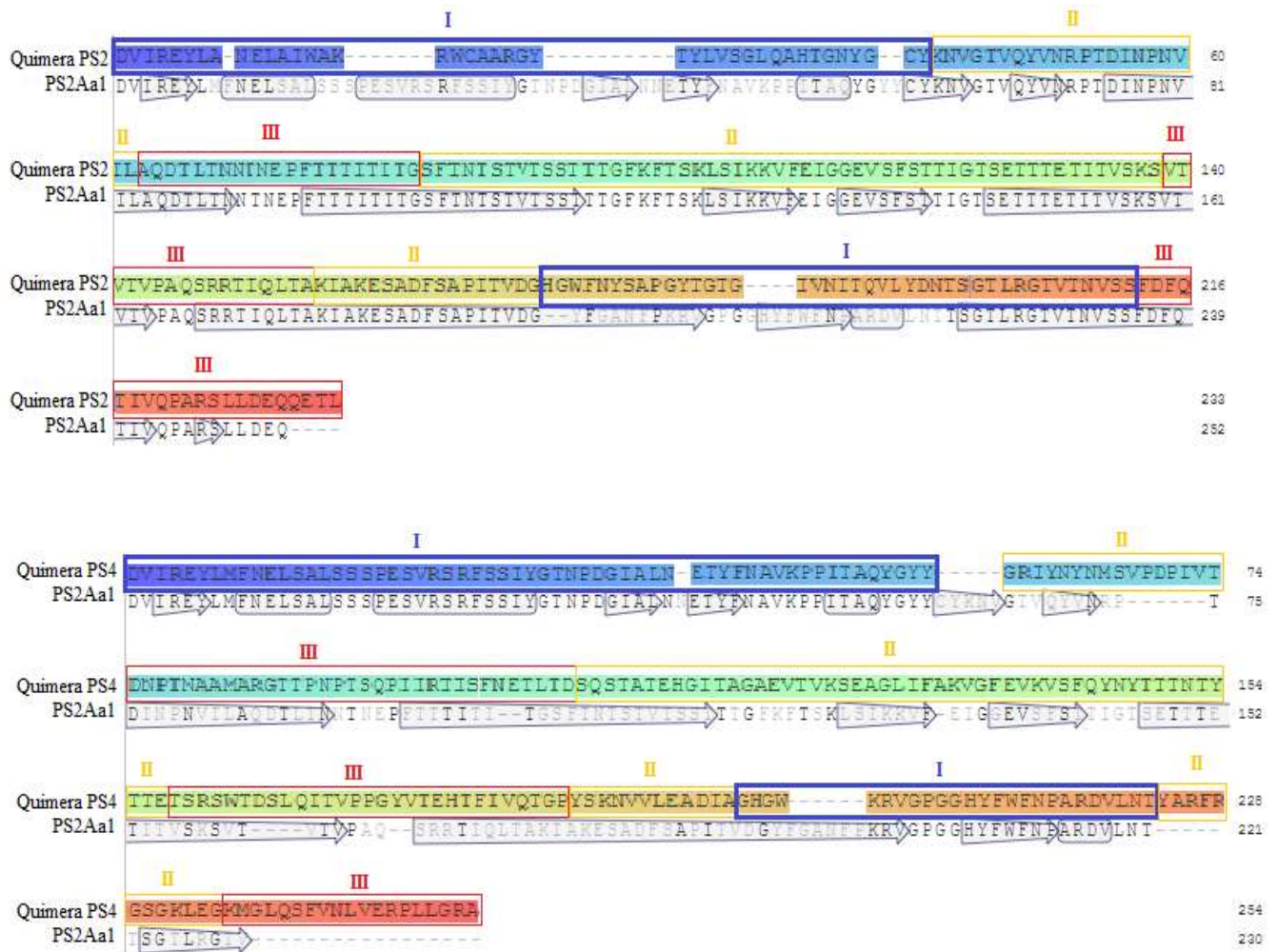
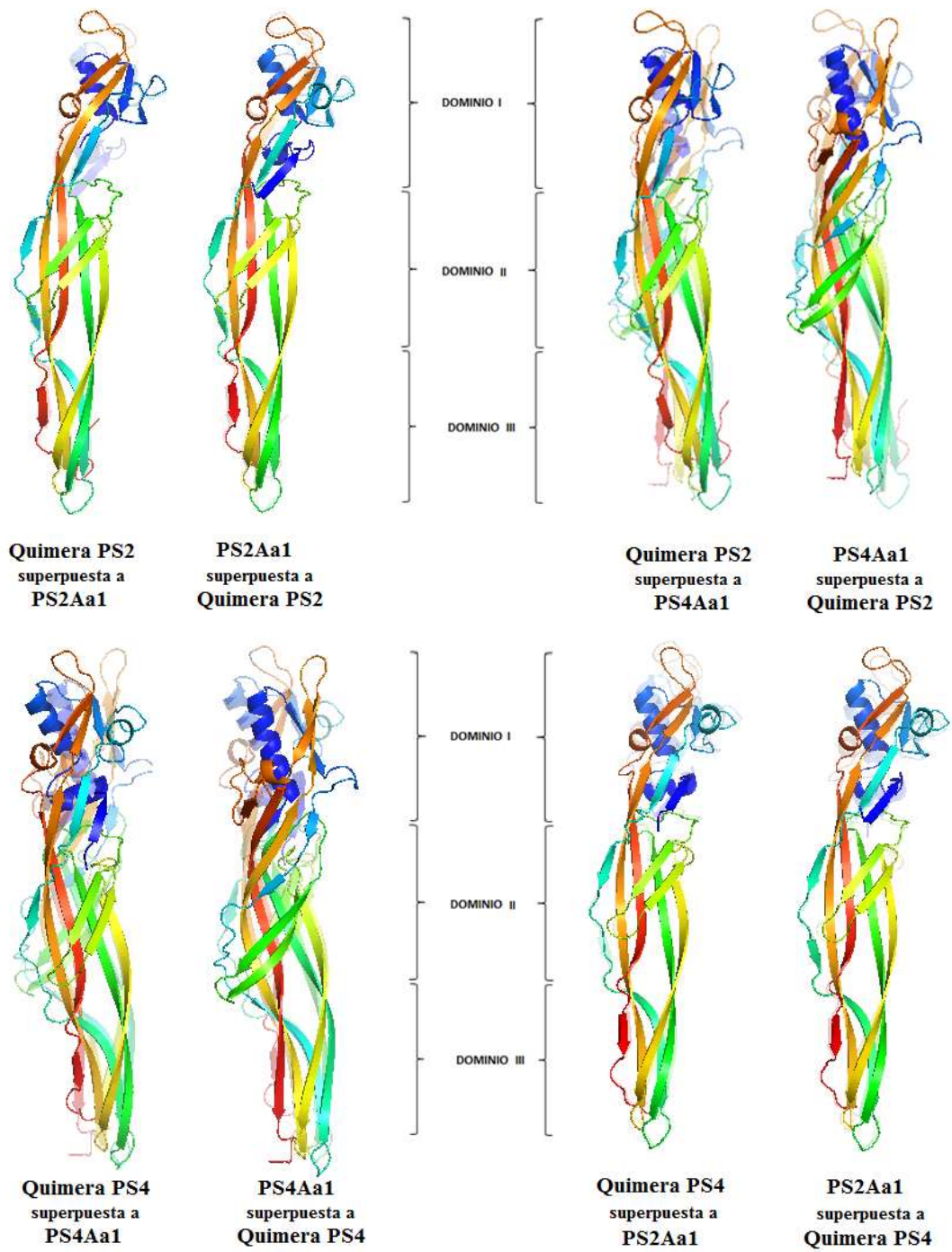


Figura 17. Alineamiento de las quimeras con su template



**Figura18. Alineamiento estructural de las Quimera con las parasporinas 2 y 4**

### 7.8.3 Propiedades fisicoquímicas de las Quimeras

Las características físicas y químicas de las nuevas toxinas quiméricas se predijeron en base a las secuencias aminoacídicas (Tabla 8).

**TABLA 8. Propiedades físicas y químicas de las quimeras PS2 y PS4.**

	Pro-Quimera PS2	Quimera PS2 tóxica	Pro-Quimera PS4	Quimera PS4 tóxica
<b>No. De residuos</b>	316	233	333	254
<b>Peso molecular</b>	34879.82	25289.18	36983.40	28042.34
<b>pI</b>	5.44	6.16	5.55	6.49
<b>Fórmula</b>	C <sub>1529</sub> H <sub>2371</sub> N <sub>411</sub> O <sub>499</sub> S <sub>12</sub>	C <sub>1120</sub> H <sub>1759</sub> N <sub>297</sub> O <sub>365</sub> S <sub>2</sub>	C <sub>1647</sub> H <sub>2518</sub> N <sub>438</sub> O <sub>511</sub> S <sub>11</sub>	C <sub>1258</sub> H <sub>1921</sub> N <sub>335</sub> O <sub>386</sub> S <sub>4</sub>
<b>Átomos</b>	4822	3543	5125	3904
<b>Coefficiente de extinción</b>	43235* 42860**	30035* 29910**	46425* 46300**	38850*
<b>Vida media estimada</b>	30 h mamíferos ( <i>in vitro</i> ) >20 h levaduras ( <i>in vivo</i> ) >10 h <i>E. coli</i> ( <i>in vivo</i> )	1.1 h mamíferos ( <i>in vitro</i> ) 3 min levaduras ( <i>in vivo</i> ) >10 h <i>E. coli</i> ( <i>in vivo</i> )	30 h mamíferos ( <i>in vitro</i> ) >20 h levaduras ( <i>in vivo</i> ) >10 h <i>E. coli</i> ( <i>in vivo</i> )	1.1 h mamíferos ( <i>in vitro</i> ) 3 min levaduras ( <i>in vivo</i> ) >10 h <i>E. coli</i> ( <i>in vivo</i> )
<b>Índice de inestabilidad</b>	30.36	23.37	37.16	30.79
<b>Índice alifático</b>	66.90	78.20	71.08	71.38
<b>Hidropatía (GRAVY)</b>	-0.396	-0.184	-0.363	-0.334
<b>Composición de aminoácidos</b>	Ala (A) 15 4.7% Arg (R) 10 3.2% Asn (N) 21 6.6% Asp (D) 13 4.1% Cys (C) 7 2.2% Gln (Q) 19 6.0% Glu (E) 15 4.7% Gly (G) 23 7.3% His (H) 4 1.3% Ile (I) 18 5.7% Leu (L) 16 5.1% Lys (K) 13 4.1% Met (M) 5 1.6% Phe (F) 13 4.1% Pro (P) 12 3.8% Ser (S) 25 7.9% Thr (T) 47 4.9% Trp (W) 4 1.3% Tyr (Y) 14 4.4% Val (V) 22 7.0% Pyl (O) 0 0.0% Sec (U) 0 0.0%	Ala (A) 14 6.0% Arg (R) 8 3.4% Asn (N) 14 6.0% Asp (D) 8 3.4% Cys (C) 2 0.9% Gln (Q) 10 4.3% Glu (E) 10 4.3% Gly (G) 17 7.3% His (H) 2 0.9% Ile (I) 16 6.9% Leu (L) 13 5.6% Lys (K) 9 3.9% Met (M) 0 0.0% Phe (F) 10 4.3% Pro (P) 7 3.0% Ser (S) 20 8.6% Thr (T) 42 18.0% Trp (W) 3 1.3% Tyr (Y) 9 3.9% Val (V) 19 8.2% Pyl (O) 0 0.0% Sec (U) 0 0.0%	Ala (A) 17 5.1% Arg (R) 15 4.5% Asn (N) 21 6.3% Asp (D) 14 4.2% Cys (C) 3 0.9% Gln (Q) 14 4.2% Glu (E) 17 5.1% Gly (G) 26 7.8% His (H) 6 1.8% Ile (I) 18 5.4% Leu (L) 19 5.7% Lys (K) 10 3.0% Met (M) 8 2.4% Phe (F) 14 4.2% Pro (P) 22 6.6% Ser (S) 27 8.1% Thr (T) 33 9.9% Trp (W) 3 0.9% Tyr (Y) 20 6.0% Val (V) 26 7.8% Pyl (O) 0 0.0% Sec (U) 0 0.0%	Ala (A) 17 6.7% Arg (R) 13 5.1% Asn (N) 16 6.3% Asp (D) 8 3.1% Cys (C) 0 0.0% Gln (Q) 7 2.8% Glu (E) 14 5.5% Gly (G) 21 8.3% His (H) 4 1.6% Ile (I) 14 5.5% Leu (L) 14 5.5% Lys (K) 8 3.1% Met (M) 4 1.6% Phe (F) 12 4.7% Pro (P) 16 6.3% Ser (S) 21 8.3% Thr (T) 28 11.0% Trp (W) 3 1.2% Tyr (Y) 15 5.9% Val (V) 19 7.5% Pyl (O) 0 0.0% Sec (U) 0 0.0%

\*Coefficiente de extinción suponiendo que todos los pares de residuos de Cys forman cistinas

\*\*Coefficiente de extinción suponiendo que todos los residuos de Cys se reducen



## 7.9 Construcción del vector de expresión

A partir de la secuencia aminoacídica de las quimeras, se hizo la construcción de un vector de expresión heteróloga para probar *in vitro* la actividad biológica de las nuevas toxinas. Para este sistema se seleccionó el vector pET-23a (+), que es un vector de alto nivel de expresión para la producción de proteínas con etiqueta T7 hacia el N-terminal e His-Tag hacia el C-terminal, que permite la purificación por cromatografía de afinidad de la proteína recombinante. Figuras 19 y 20.

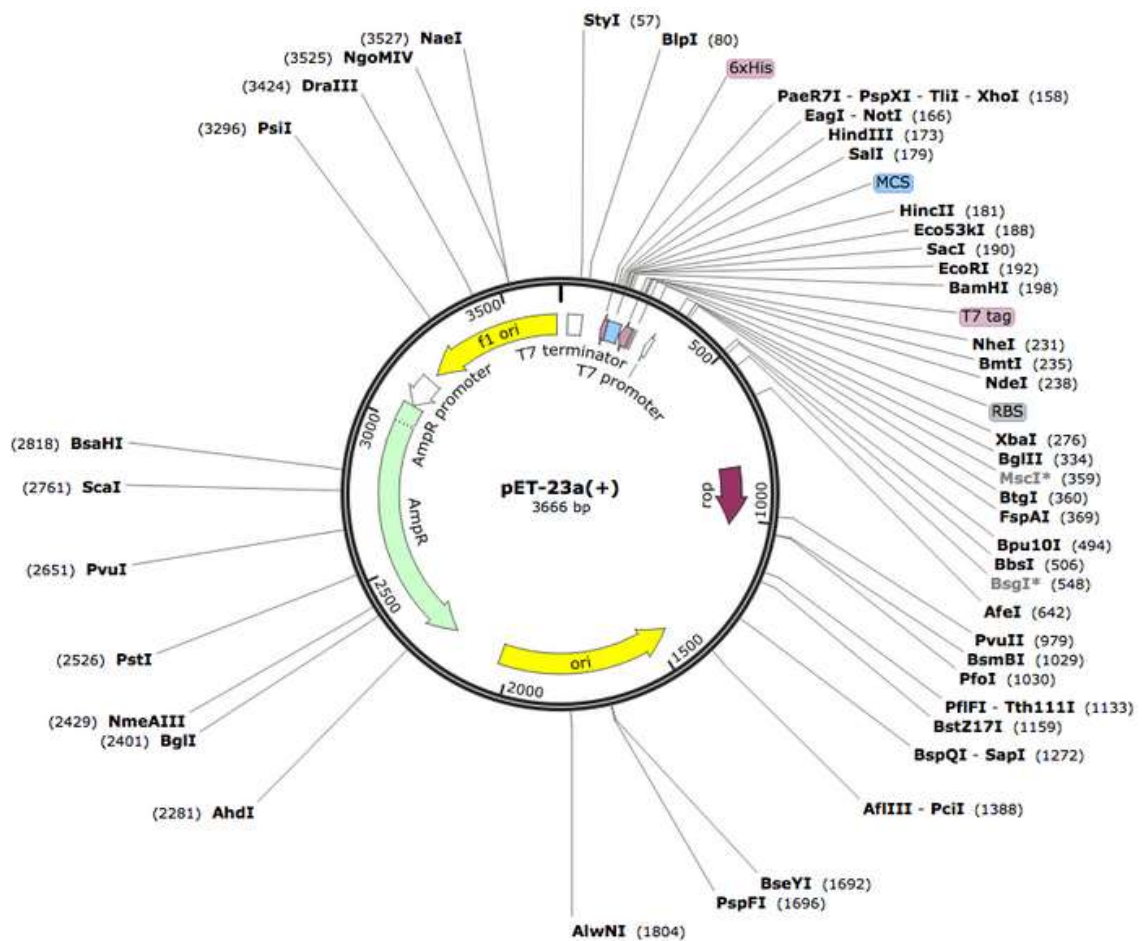


Figura 19. Vector de expresión pET-23a (+)



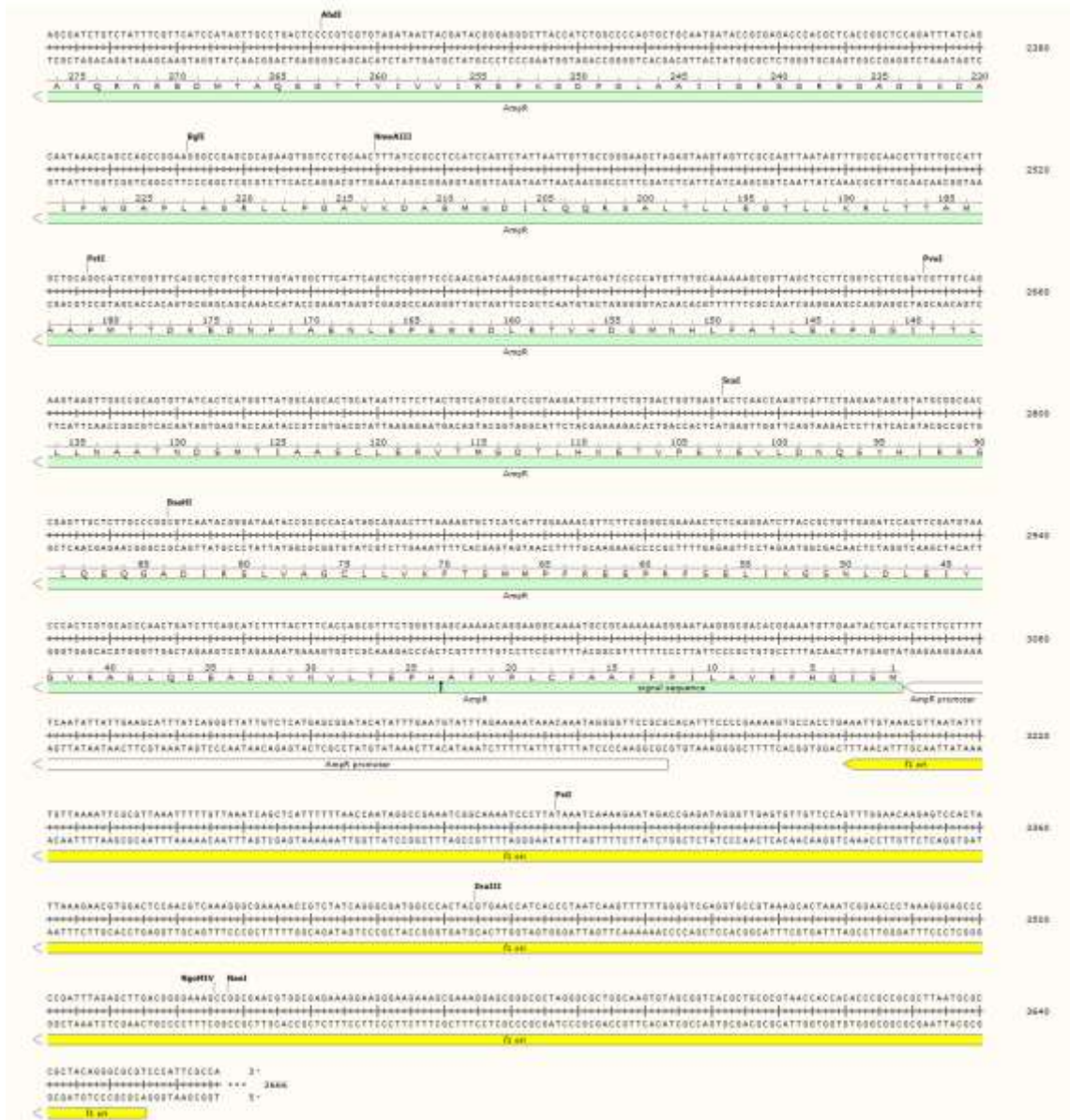


Figura 20. Secuencia desarrollada del vector de expresión pET-23a (+)

Se seleccionaron los sitios de restricción Eco RI y Hind III en el vector de expresión para insertar la secuencia de interés, que este caso corresponde a la de la PS2Aa1, PS4Aa1, Quimera PS2 y Quimera PS4. Figura 21, 22, 23 y 24.

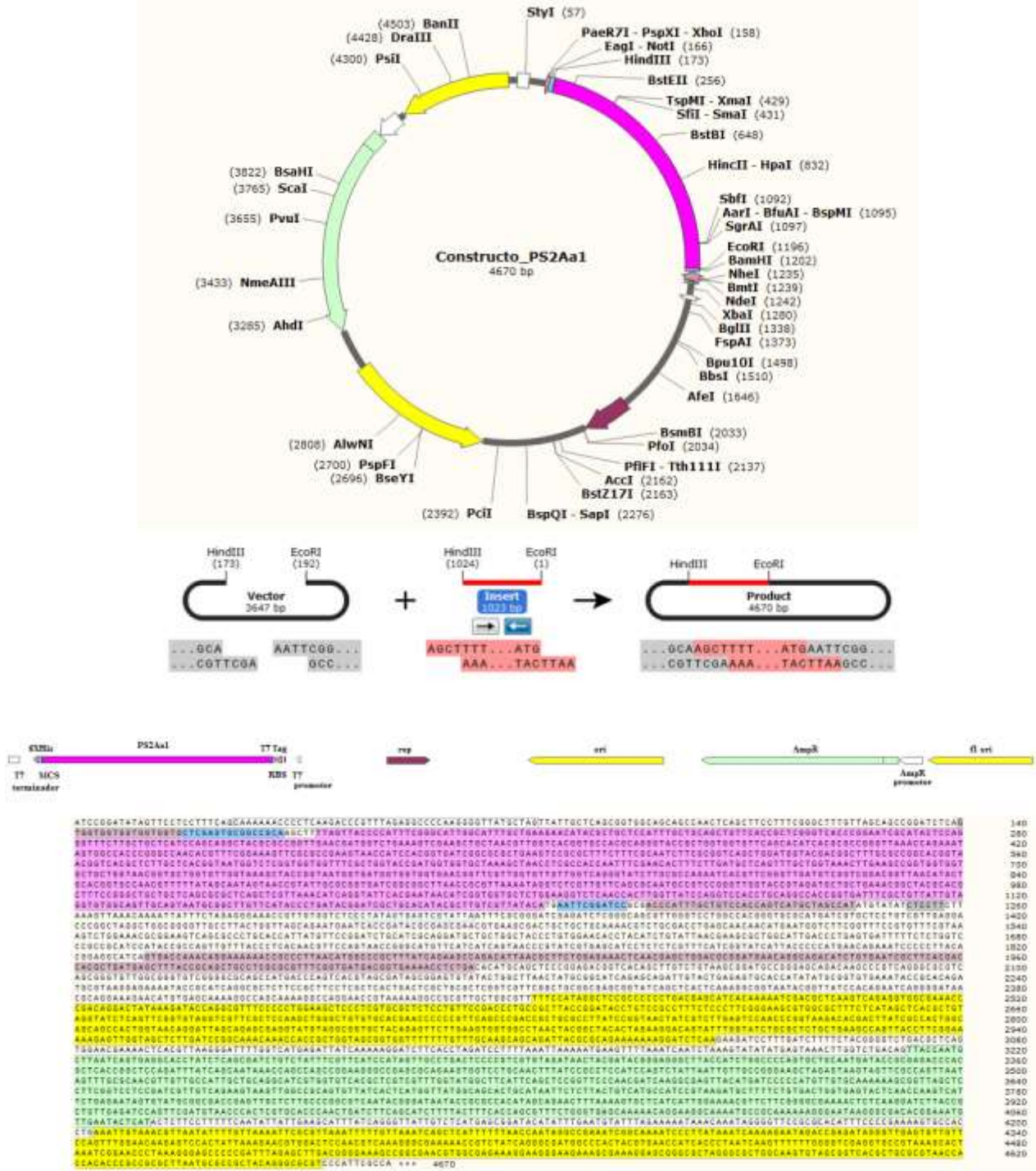


Figura 21. Construcción y secuencia condensada del vector con el gen para la PS2Aa1

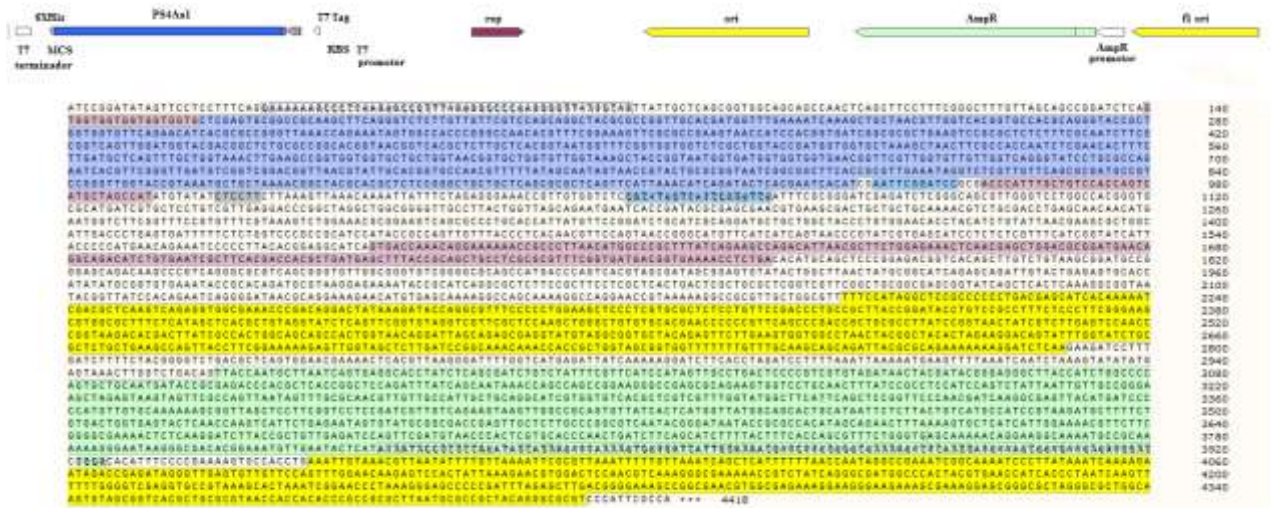
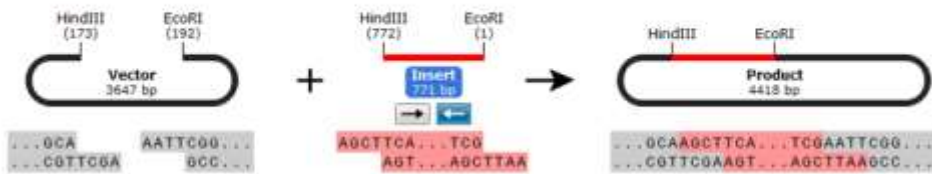
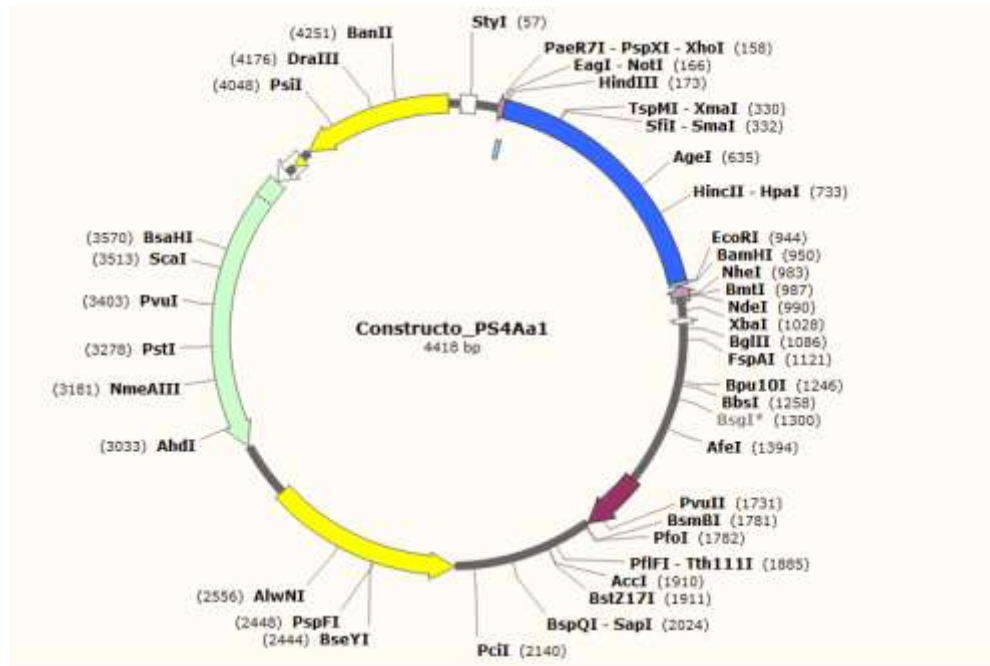


Figura 22. Construcción y secuencia condensada del vector con el gen para la PS4Aa1

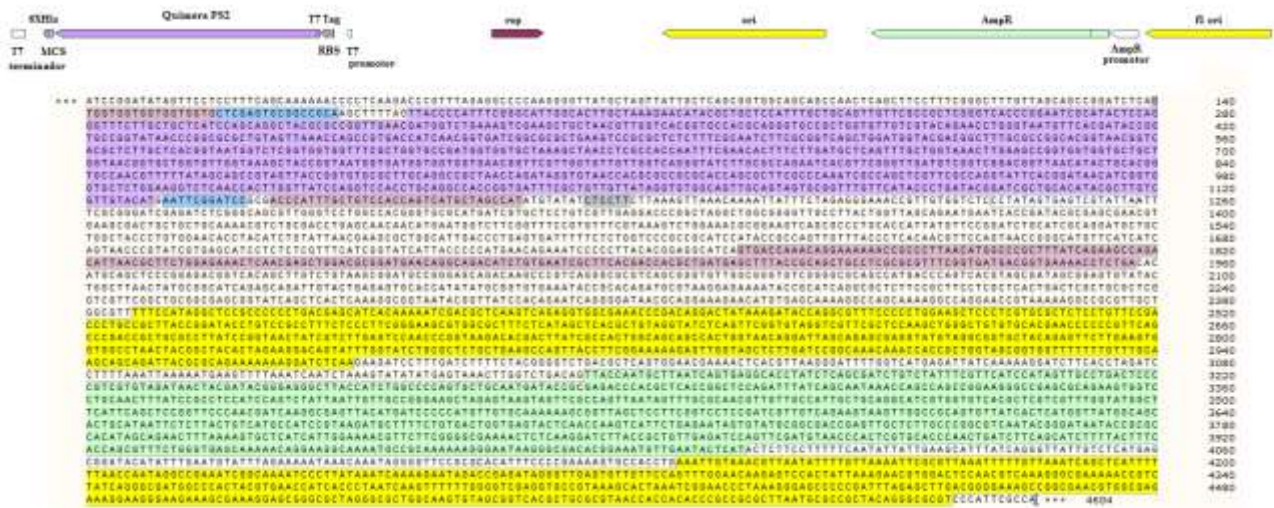
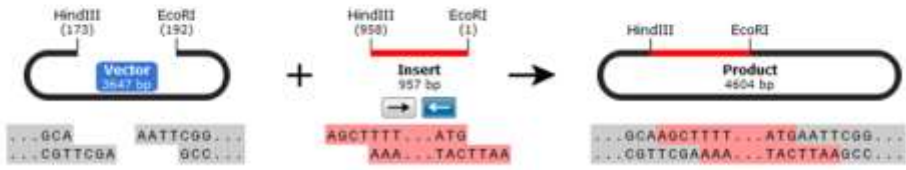
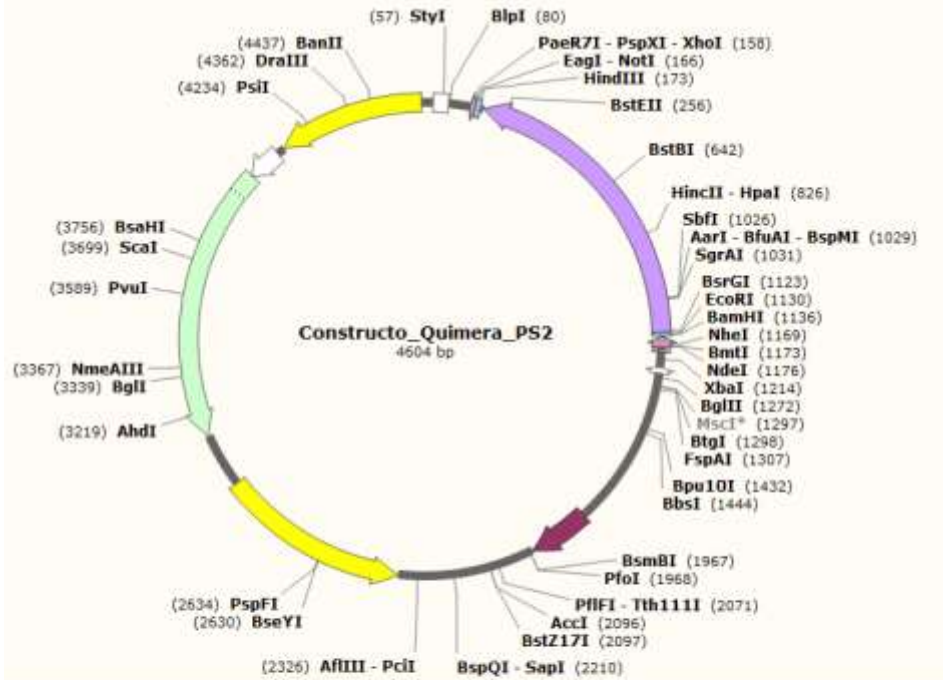


Figura 23. Construcción y secuencia condensada del vector con el gen para la Quimera de la PS2

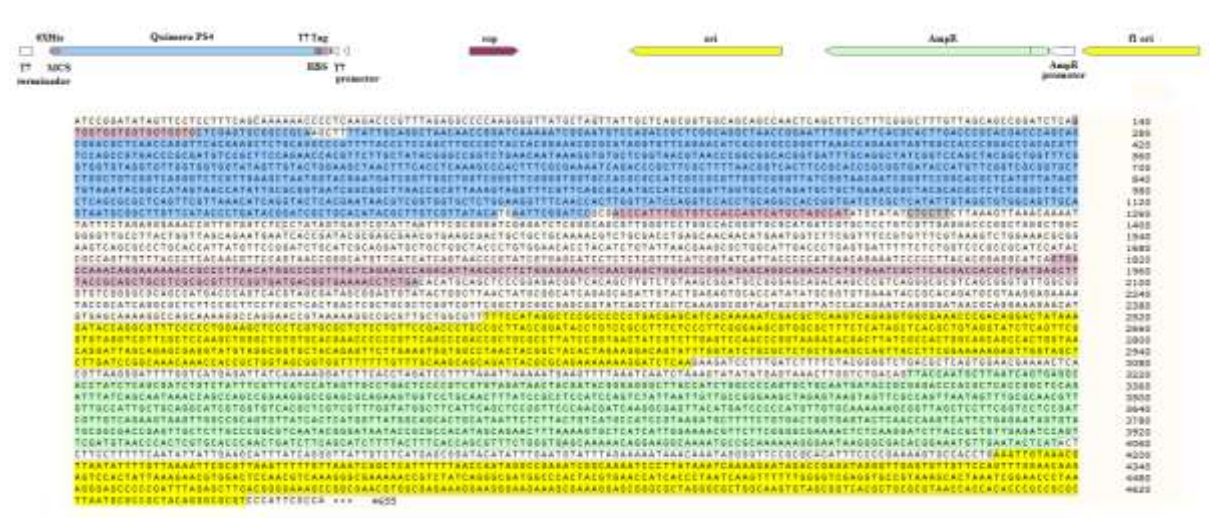
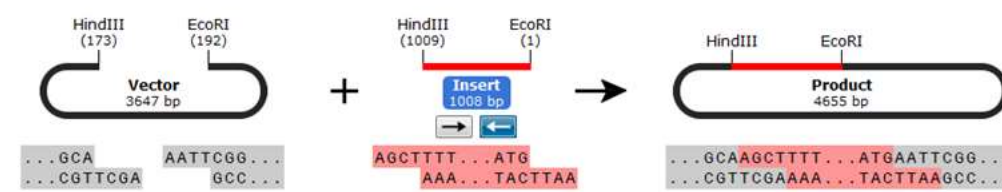
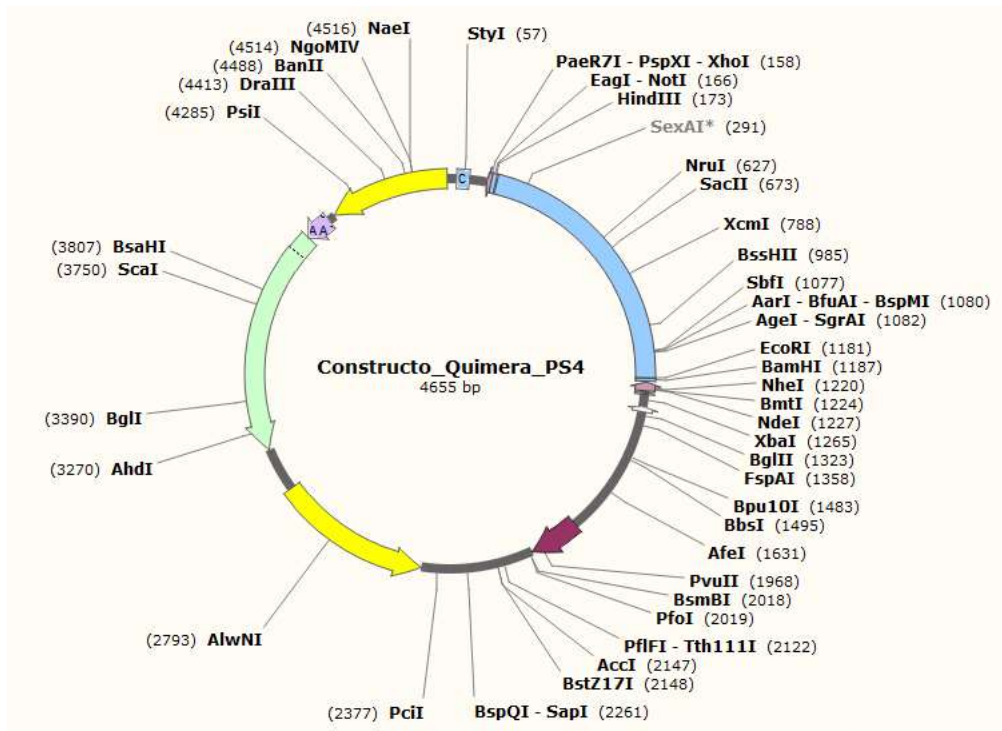


Figura 24. Construcción y secuencia condensada del vector con el gen para la Quimera de la PS4

El vector de expresión seleccionado con la secuencia de los genes para las parasporina PS2Aa1, PS4Aa1, Quimera PS2 y Quimera PS4 insertada entre los sitios de restricción elegidos, fueron mandados a sintetizar a GenScript. Los vectores nos fueron entregados en células DH5 $\alpha$  conservadas en glicerol, listos para su evaluación en estudios posteriores.



## 8. DISCUSIÓN

Las secuencias aminoacídicas primarias de las PS2Aa1 y PS4Aa1 que se analizaron mediante BLAST, PSI-BLAST y otras herramientas bioinformáticas mostraron resultados esperados y concluyentes, entre estos se encontró que mantienen similitud con diferentes proteínas que presentan características del grupo de las  $\beta$ -TFP, el cual conforman proteínas que como modo de acción forman poros en membrana celular (Gilbert *et al.*, 2001). La PS2Aa1 mostro alta similitud con proteínas hipotéticas de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Acidobacteriacea bacterium* entre otras, mostro también alta similitud (<38%) con diversas hidralisinas pertenecientes a diferentes géneros, entre ellos los de distintos *Bacillus sp.*, mismas que forman parte del grupo de las  $\beta$ -TFP anteriormente mencionadas y que se unen a la membrana de eritrocitos generando poros (Sher *et al.*, 2005). La PS4Aa1 mostro una similitud alta con diferentes proteínas hipotéticas de géneros bacterianos como *Bacillus*, *Virgibacillus* o *Nocardia* con un valor esperado o mayor a la línea base, mostro también similitud, aunque con un E-value menor a la línea base, se encontró similitud con la toxina ETX mosquitocida pertenecientes a la familia de las proteínas MTX2 entre las que se pueden encontrar las toxinas tipo Epsilon-toxin de *Clostridium perfringens* (Poppof 2011), misma que es causante de enterotoxemias en animales (Alves *et al.*, 2014) El E-value de la comparación entre la PS4Aa1 y la ETX-MTX2 mostrado en la tabla 4, se debe muy probablemente al hecho de que solo una pequeña fracción de la secuencia de la PS4Aa1 analizado mantiene esa similitud con la ETX mosquitocidal.

La deducción de los dominios estructurales de las parasporinas PS2Aa1 y PS4Aa1 se hizo con la predicción de la estructura terciaria de ambas proteínas en forma inactiva, como pro toxina. El programa Raptor X como el Swiss Model hicieron una predicción bastante cercana para las dos proteínas, tomando como mejor templado el de la PS2Aa1 activa encontrada en el banco de datos PDB ID: 2ZTBA y la PS4Aa1 PDB ID: 2D42A es importante mencionar que los siguientes templados con mejor cobertura para las proteínas de interés fueron la de la Pro-Aerolisina para PS2Aa1 y la ETX para la PS4Aa1. De entre los resultados arrojados, se decidió trabajar con la plataforma Raptor X, ya que este logra una moldeamiento con una cobertura del 100% debido a que toma en cuenta los

aminoácidos que no se alinean a las estructuras secundarias del templado y aunque pudiera no lograr un buen moldeamiento de los extremos N y C- Terminal de las Pro-Toxinas, si los muestra como espirales o coils al azar a diferencia del Swiss Model que logra el moldeamiento de entre el 74% al 89% , lo que hace que las predicciones queden prácticamente igual a su templado (Wang *et al.*, 2016 ; Schwede *et al.*, 2003)

Los alineamientos estructurales que se realizaron para la designación de dominios fueron hechos con dominios conservados de la PFAM, mismo que coincidieron con el BLAST en la identificación de una región conservada de un dominio perteneciente a la superfamilia de la toxina épsilon de *Clostridium* y ETX/MTX2 de *Bacillus* (Thanabalu & Porter, 1996), así como algunas otras  $\beta$ -TFP bien caracterizadas pertenecientes a esta superfamilia como la Cry23Aa1 y la Cry51Aa1 de Bt, la cual posee actividad insecticida formando poros en membrana, peor que no poseen la misma estructura típica de las Cry (Palma *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015). Cabe destacar que todas las proteínas que tuvieron relación estructural con la PS2Aa1 y la PS4Aa1 son formadoras de poro, pero algunas de ellas no son bacterianas, tal es el caso de la 5DI0Ab, que es una toxina tipo aerolisina aislada del caballito de mar *Danio reiro* (Jia *et al.*, 2015) y otras más mencionadas en la tabla 6 de los resultados.

La identificación y anotación de los potenciales dominios estructurales de las dos parasporinas nos verifica la información obtenida basada en las estructuras ya predichas y descritas con anterioridad. Las dos moléculas constan de tres dominios conformados a su vez por hélices alfa y láminas beta en su dominio I, el cual se cree que actúa como presunto responsable del reconocimiento a los receptores de membrana, lo que al parecer lo hace también el más variable entre ambas proteínas. Dentro del dominio II se encuentra un motivo estructural clave para su delimitación y su posible función denominado como Horquilla anfipática, la cual se cree que participa en la oligomerización y formación del  $\beta$  barril transmembranal como el de las  $\alpha$ -hemolisinas (Akiba *et al.*, 2006; Song *et al.*, 1996). El dominio III está conformado también por laminas beta antiparalela y se caracteriza por que su constitución de residuos hidrofóbicos que al formar el oligómero quedan insertados en las células para formar el poro transmembranal.

Para poder hacer el modelamiento de quimeras, se optó por intercambio del Dominio I entre ambas proteínas, el cual al parecer es el más variable debido a que se piensa es el responsable de especificidad hacia el receptor y por lo tanto hacia sus células blanco. Los alineamientos estructurales realizados entre la PS2Aa1 y la PS4Aa1 con una cobertura total del 84%, dieron una similitud de 21.95%; la mejor cobertura fue la correspondiente al dominio II, después la del dominio III y por último la del dominio I, donde se analizó la primera parte de la secuencia hacia el extremo N-Terminal y se encontró que estructuralmente no tiene relación con ninguna TFP, el caso del dominio I de la PS2Aa1 se encontró similitud con proteínas de replicación y de inhibición de conjugación bacteriana (PDB ID: 3DKx.1C; PDB ID: 1DV0.1A), para el dominio I de la PS4Aa1 no hubo similitud significativa con ninguna estructura conocida, lo que nuevamente nos sugiere que el Dominio I es altamente variable y poco conservado, por lo cual se decidió hacer el intercambio *in silico* de este mismo entre ambas parasporinas. Cabe señalar que en la quimera PS4 con el dominio I intercambiado de la PS2, se tuvo que hacer un arreglo de residuos aminoácidos con el fin de que la conformación de los dominios II y III no se vieran afectados al momento de arrojarlos la predicción de la estructura. Los resultados de las características conformacionales de las predicciones entre las Pro-Toxinas nativas y quiméricas demuestran que no hay una gran diferencia entre los porcentajes de hélices alfa y láminas beta contenidas en la estructura, sin embargo, hay una mayor diferencia entre los espirales al azar, esto se presenta probablemente por lo ya mencionando con anterioridad acerca de la cobertura de aminoácidos en la plataforma Raptor X. Del mismo modo que con las proteínas nativas, se hizo la anotación y delimitación de los dominios de las quimeras de la PS2 y PS4. Se observa que los dominios II y III de ambas quimeras son muy parecidas a las nativas, caso contrario para el dominio I, en donde se aprecia una diferencia entre las nativas y las quimeras, donde el arreglo de aminoácidos realizado en la quimera PS4 nos sugiere que este dominio puede estar también involucrado en el modelamiento de toda la proteína. El correcto pegamiento y conservación de las estructuras se corroboró mediante un alineamiento estructural entre las proteínas nativas y quiméricas, en donde la superposición es prácticamente idéntica para el dominio II y III con las PS2Aa1 que recordemos se usó como templado para las predicciones.

Por otro lado, las características fisicoquímicas predichas por el Protparam revelaron varios aspectos importantes de las proteínas de interés. En primer lugar, llama la atención el Punto Isoeléctrico teórico, el cual, es similar para las pro toxinas de PS2Aa1 y PS4Aa1 así como para la fracción toxica de la PS2Aa1 que muestran un pH ácido, mientras que a fracción toxica de la PS4Aa1 tiene un PI más cercano a la neutralidad, en contraste con nuestras quimeras, en donde ambas Pro-Quimeras obtienen valores con pH más ácidos y las fracciones toxicas obtienen un pH más cercano a la neutralidad. Cabe mencionar que algunas proteínas a un pH ácido tiene más facilidad de fusión y/o unión hacia los receptores encontrados en membranas (Farias *et al.*, 1989), se debe recordar que la carga neta de una proteína está fuertemente influenciada por el pH de una solución, de modo que una toxina con pI cercano a la neutralidad pudiera verse afectado en su solubilidad al mantener un pH muy parecido al medio de cultivo o buffer utilizado, lo cual a su vez, afectaría los resultados de un bioensayo (Principios de Bioquímica., Lehninger 4ta edición). Resaltando las comparaciones entre nuestros resultados, se puede observar que el comportamiento en la diferencia de valores entre proteínas Nativas y quiméricas como Pro-Toxina y fracción toxica mantiene casi el mismo rango, cabe señalar que la cantidad de aminoácidos en las proteínas, así como composición de las mismas pueden afectar el Punto isoeléctrico (Kiraga *et al.*, 2006). Es importante mencionar que si bien, una característica importante sobre las proteínas transmembranales es su pI de carácter básico, también es importante resaltar que las proteínas Cyt aisladas de los cristales paraesporales de ciertas cepas de Bt, y que son formadoras de poro de membrana, actúan con un pI de carácter ácido. (Bravo *et al.*, 2008).

En los resultados de coeficiente de extinción, el cual indica cuanta luz es absorbida por una proteína en una longitud de onda determinada, mismo que nos permite hacer una cuantificación de la misma, se deben obtener por lo general dos valores, uno teniendo en cuenta todos los pares de cisteínas y otro asumiendo que todos los residuos de cisteína están reducidos. Esto se debe al que el grupo sulfhídrico de la cisteína es altamente reactivo y por lo tanto reaccionando de manera común con una oxidación reversible que forma un disulfido. En el caso de la pro toxina de PS2Aa1, se recomienda utilizar el coeficiente 33350, ya que teóricamente su secuencia no contiene puentes disulfuro entre sus cisteínas (Akiba *et al.*, 2008), el resto de nuestras proteínas, tanto nativas como

quimeras y protoxinas como activadas, el coeficiente de extinción se muestra como alto. Un compuesto con un alto valor de coeficiente de extinción molar es muy eficiente en la absorción de luz de la longitud de onda adecuada, y por lo tanto puede detectarse por medidas de absorción cuando se encuentra en disolución a concentraciones muy bajas (Principios de Bioquímica., Lehninger 4ta edición).

Otro factor que considerar en los resultados es la vida media estimada, la cual es una predicción de tiempo en el cual la mitad de las moléculas se degrada dentro de la célula después de ser sintetizada (Walker 2005). Los resultados están estimados en tres organismos modelos, mamíferos, levaduras y *E. coli*, para las pro toxinas de PS2Aa1 y PS2Aa1 la mayor vida media estimada se encontró en mamíferos, para las fracciones toxicas la mayor vida media se estimó en *E. coli* para PS2Aa1 y en levaduras para PS4Aa1. La vida media estimada para las quimeras no muestra mucha diferencia entre las nativas, este aspecto varia solo para la fracción toxica de la quimera PS4, en donde su mayor vida media estimada se presenta en *E. coli*, esto pudiera estar determinado por la “regla del extremo N-terminal”, la cual se relaciona con la identidad de los residuos aminoacídicos (Varshavsky *et al.*, 1997) por lo que al momento de activar las parasporinas deja extremos N-Terminal más susceptibles para la ubiquitinación, la cual es una señal celular para la degradación de proteínas (Lecker, Goldberg & Mitch, 2006), que como resultados pudiera recortar la vida media en ciertos organismos como en el caso de las fracciones toxicas en mamíferos.

Los índices de Inestabilidad (II) de las proteínas analizadas resultaron menores a 35, lo cual se considera como estable, para la Pro quimera PS4 se reporta un II de 37.16, rango que es reconocido como estable también. Recordando que el II es un estimado de la estabilidad de una proteína en un tubo de ensaye y señalando como un valor aceptable <40 y un valor inestable seria > 40 (Guruprasad, Reddy & Pandit, 1990), se puede decir que nuestras proteínas serian aptas para su estudio en condiciones estables dentro de un laboratorio.

El índice alifático, que es el volumen relativo ocupado por cadenas alifáticas y que se considera un factor para la termoestabilidad de las proteínas, en donde aquellas pertenecientes a organismos termófilos tienen índices más altos (Ikai, 1980), fue predicho para las secuencias de nuestras proteínas dando como resultado un índice alifático mayor a 70 para las Pro toxinas de PS4 nativas y quiméricas y las fracciones tóxicas de PS2 y PS4 nativas y quiméricas, lo que se considera como termoestable, el resultado de la Pro-Ps2 nativa y quimérica fue un ligeramente menor, por lo que muy probablemente no se vería afectada su termoestabilidad. El índice de inestabilidad y el índice alifático pueden servir como indicio de la solubilidad que pudieran tener las proteínas sobre expresadas en sistemas heterólogos (Idicula-Thomas & Balaji, 2005).

El número GRAVY (Grand Averigüe of Hidropatía) determina la hidrofobicidad o hidrofiliidad de una proteína y se mide en un rango de entre -2 y +2 para la mayoría de las proteínas en donde los valores positivos, están más relacionados con comportamientos hidrofóbicos (Walker *et al.*, 2005). Las secuencias analizadas de nuestras proteínas de interés tanto nativas como quiméricas, curiosamente muestran valores hidrofílicos, lo cual puede ser favorable en el paso de solubilización, esto por presencia de grupos polares en las cadenas laterales localizadas en las superficies de las proteínas, a diferencia de las hidrofóbicas que se encuentran en el interior (Kbyte & Doliste, 1982). Cabe mencionar que una posible desventaja al momento del plegamiento de las proteínas sería el hecho de que los residuos hidrofílicos pudieran no estar tan accesibles y en su defecto la solubilidad se viera afectada, ya que al tratarse de proteínas formadoras de poro y al momento de ser activadas, pudieran no actuar de manera eficiente o en su defecto el nulo reconocimiento de su receptor, bloqueando así su posible modo de acción.

Por último y con la ayuda de herramientas bioinformáticas como GENTle, UGENE y la plataforma de Gen Script se construyó y seleccionó el vector de expresión heteróloga Pet-23a(+) para probar *in vitro* la actividad biológica. La selección de este vector fue hecha en base a su alto nivel de expresión así como sus características, entre las cuales destaca una His-Tag en el extremo C-Terminal que sirve para la purificación mediante cromatografía de afinidad, el promotor y marcador T7/amp y sus sitios de restricción, entre los cuales se encuentran el EcoR1 y Hind III, mismo que fueron seleccionados por

su fácil acceso al momento de hacer el ensayo de restricción, así como por su gran uso en diferentes estudios relacionas con proteínas de interés (Dragosits, Niklas & Tagkopoulus, 2012). Entre estos sitios de restricción se decidió insertar la secuencia nucleotídica de los genes de las proteínas Nativas y quiméricas, mismo que fueron mandados sintetizar.

## 9. CONCLUSIONES

1. Las parasporinas PS2Aa1 y PS4Aa1 tienen una alta relación estructural hacia otras proteínas formadoras de poros y ambas contienen un dominio ETX/MTX conservado, perteneciente a la superfamilia de proteínas formadoras de poros MTX.
2. Las predicciones tridimensionales de la PS2Aa1 y PS4aa1 fueron idénticas a las estructuras cristalográficas reportadas Akiba y col. en 2006 y 2009, usando el portal RaptorX Structure Prediction
3. Se predijeron y delimitaron *in silico* tres dominios estructurales con posible actividad biológica definida. El dominio I, se plantea estar implicado en el reconocimiento de células blanco y por tato en la especificidad de las toxinas; también es el que presenta mayor variabilidad entre las TFP. Los dominios II y III son los más conservados estructuralmente y se cree que tienen un rol específico en la oligomerización, inserción y formación de poros en membrana plasmática.
4. Se diseñaron dos nuevas proteínas quiméricas de PS2Aa1 y PS4Aa1, mediante el intercambio del dominio I, sin afectar la estructura tridimensional de los dominios II y III o las propiedades físico-químicas globales que caracterizan a las TPF.



## 10. PERSPECTIVAS

1. El uso de herramientas bioinformáticas va más allá del hecho de predecir o modificar proteína o material genético en un rango virtual, es una herramienta que seguirá aportando datos útiles para una evaluación y experimentación más certera y aproximada a los datos reales, lo cual ayudará a mejorar y/o crear diferentes tipos de terapias y tratamientos.
2. Las parasporinas son toxinas que presentan mucho potencial para su uso futuro como tratamiento anti cáncer, ya que con el paso de los años han sido descubiertas más tipos con características comunes, pero a su vez específicas para distintos tipos de cáncer por lo cual es de suma importancia seguir estudiándolas y analizándolas.
3. El estudio *in silico* de las parasporinas, en este caso PS2Aa1 y PS4Aa1 nos sugiere la acción de cada dominio estructural, esto es de gran ayuda para entender el funcionamiento de las proteínas, así como modificar, predecir y tal vez más adelante crear proteínas con una amplia acción hacia células blanco distintas y una actividad toxica eficaz contra células humanas anormales.

## 11. BIBLIOGRAFIA

Abe Y, Kitada S, Kuge O, Ohba M, Ito A. 2005. Oligomerization of parasporin-2, a new crystal protein from non-insecticidal *Bacillus thuringiensis*, in lipid rafts. In Coté J, Otvos I, Scwartz J, Vincent C (Eds.). 6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its Environmental Impact 113–115.

Abe Y, Shimada H, Kitada S. 2008. Raft-targeting and oligomerization of parasporin-2, a *Bacillus thuringiensis* crystal protein with anti-tumor activity. *Journal of Biochemistry* 143:269–275.

Akiba T, Abe Y, Kitada S, Kusaka Y, Ito A, Ichimatsu T, Harata K. 2004. Crystallization of parasporin-2, a *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic activity against human cells. *Acta Crystallographica* 60:2355–2357.

Akiba T, Ichimatsu T, Katayama H, Akao T, Higuchi T, Mizuki E, Kitada A, Ito A, Kanai R, Harata K. 2002 Structural studies of mammalian cell recognizing crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* 6A, G305.

Akiba, T., Higuchi, K., Mizuki, E., Ekino, K., Shin, T., Ohba, M., ... Harata, K. 2006. Nontoxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* demonstrates a remarkable structural similarity to  $\beta$ -pore-forming toxins. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 63(1), 243–248. <https://doi.org/10.1002/prot.20843>

Akiba T., Abe Y, Kitada S, Kusaka Y, Ito A, Ichimatsu T, Harata K. 2008. Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells. *Journal of Molecular Biology* 386:121–133.

Alves, G. G., de Ávila, R. A. M., Chávez-Olórtegui, C. D., & Lobato, F. C. F. 2014. *Clostridium perfringens* epsilon toxin: The third most potent bacterial toxin known. *Anaerobe*, 30, 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.08.016>

Bravo Alejandro, Gill Sarjeet, S. M. 2008. Their Potential for Insect Control. *National Institutes Access*, 49(4), 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>

Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill S, Sóberon M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect biochemistry and Molecular biology*. 41: 423-431.

Bokori-Brown, M., Kokkinidou, M. C., Savva, C. G., Da Costa, S. P. F., Naylor, C. E., Cole, A. R., Titball, R. W. 2013. Clostridium perfringens epsilon toxin H149A mutant as a platform for receptor binding studies. *Protein Science*, 22(5), 650–659. <https://doi.org/10.1002/pro.2250>

Cole, A. R., Gibert, M., Popoff, M., Moss, D. S., Titball, R. W., & Basak, A. K. 2004. Clostridium perfringens epsilon-toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(8), 797–798. <https://doi.org/10.1038/nsmb804>

De Maagd RA, Bosch D, Stiekema WJ. 1999. *Bacillus thuringiensis* toxin mediated insect resistance in plants. *Trends Plant Sciences*. 4 (1):9–13

De Maagd R., Bravo A., Berry B., Crickmore N., Schnepf H. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Reviews of Genetic*. 37:409–433

Dragosits, M., Nicklas, D., & Tagkopoulos, I. (2012). A synthetic biology approach to self-regulatory recombinant protein production in Escherichia coli. *Journal of Biological Engineering*, 6(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-6-2>

Espino-Vazquez, A., Gomez-Treviño, A., Galan-Wong, L., & Pereyra-Alferez, B. 2012. Isolation of Bacillus thuringiensis strains with cytotoxic activity against MOLT-4, a leukemia cell line. *Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges*, 147–151. <https://doi.org/10.1142/9789814405041>

Farías, R. N., López Viñals, A. E., Posse, E., & Morero, R. D. 1989. Relationship between isoelectric point of native and chemically modified insulin and liposomal fusion. *The Biochemical Journal*, 264(1), 285–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1133574&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Fang, J., Xu, X., Wang, P., Zhao, J. Z., Shelton, A. M., Cheng, J., Shen, Z. 2006. Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 956–961. <https://doi.org/10.1128/AEM.02079-06>
- Feitelson, J. S. 1993. The *Bacillus thuringiensis* family tree. *Advanced Engineered Pesticides* (Kim, L., Ed.), pp. 63–71. Dekker, New York.
- Gil, C., Dorca-Arévalo, J., & Blasi, J. 2015. Clostridium perfringens epsilon toxin binds to membrane lipids and its cytotoxic action depends on sulfatide. *PLoS ONE*, 10(10), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140321>
- Gilbert R.J.C. 2001. Pore-forming toxins. Review .CMLS, Cellula and Molecular Life Sciences. 59: 832–844
- Gomez I, Sanchez J, Muñoz-Garay C, Matus V, Gill S, Soberón M, Bravo A. 2014. *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins are versatile proteins with multiple mode of action: two distinct pre-pores are involved in toxicity. *Biochemical journal*. 459(2):383-396.
- Gouaux E, Hobaugh M, Song L. alpha-Hemolysin, gamma-hemolysin, and leukocidin from *Staphylococcus aureus*: distant in sequence but similar in structure. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*. 1997; 6(12):2631-2635.
- Guruprasad, K., Reddy, B. V. B., & Pandit, M. W. 1990. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: A novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering, Design and Selection*, 4(2), 155–161. <https://doi.org/10.1093/protein/4.2.155>
- Hannay C. L, Fitz-James. P. C. 1955. Protein crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Canadian Journal of Microbiology* 1:694-710
- Heimpel, AM. 1967. A critical review of *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. *Annual Reviews Entomology*. 12: 287-322.
- Höfte, H. and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*. 53(2): 242- 255.

Idicula-thomas, S., & Balaji, P. V. 2005. Understanding the relationship between the primary structure of proteins and its propensity to be soluble on overexpression in *Escherichia coli*. *Protein Sci*, 14(3), 582–592. <https://doi.org/10.1110/ps.041009005.folded>.

Ikai, A. (1980). Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *Journal of Biochemistry*, 1898(6), 1895–1898. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Inouye K., Okumura S., Mizuki E. 2008. Parasporin-4, A Novel Cancer Cell-killing Protein Produced by *Bacillus thuringiensis*. *The Korean Society of Food Science and Technology* Vol. 17, No. 2, pp. 219-227

Ito A., Sasaguri Y., Kitada S., Kusaka Y., Kuwano K., Masutomi K., Mizuki E., Akao T., Ohba M. 2004 A *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein with Selective Cytocidal Action to Human Cells, *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 279, No. 20, pp. 21282–21286.

Jia N, Liu N, Cheng W, et al. Structural basis for receptor recognition and pore formation of a zebrafish aerolysin-like protein. *EMBO Reports*. 2016; 17(2):235-248. doi:10.15252/embr.201540851.

Jiménez SZ. 1997. Identificación de las regiones que determinan la especificidad de la  $\delta$ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Jaimes Melo, M. A. 2012. Predicción in-silico de la estructura y función de la proteína hipotética p284 de *Trypanosoma cruzi*., 1–35. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10554/11883>

Katayama H., Yokota H., Akao T., Nakamura O., Ohba M., Mekada E., Mizuki E. 2005 Parasporin-1, a Novel Cytotoxic Protein to Human Cells from Non-Insecticidal Parasporal Inclusions of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biochemistry*. 137(1): 17–25

Kim H., Saitoh H., Yamashita S., Akao T., Park Y., Maeda M., Tanaka R., Mizuki E., Ohba M. 2003 Cloning and Characterization of Two Novel Crystal Protein Genes from a *Bacillus thuringiensis* serovar *dakota* Strain Current Microbiology. 46(1): 33–38

Kim H., Yamashita S., Akao T., Saitoh H., Higuchi K., Park Y., Mizuki E., Ohba M. 2000. In vitro cytotoxicity of non-Cyt inclusion proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate against human cells, including cancer cells. Journal of Applied Microbiology, 89(1):16-23

Kitadas., Abe Y., Shimada h., Kusaka Y., Matsuo Y., Katayama H., Okumura S., Akao T., Mizuki E., Kuge O., Sasaguri Y., Ohba M., Ito A. 2006. Cytocidal Actions of Parasporin-2, an Anti-tumor Crystal Toxin from *Bacillus thuringiensis*. The journal of Biological Chemistry. Vol. 281, no. 36, pp. 26350–26360

Kiraga, J., Mackiewicz, P., Mackiewicz, D., Kowalczyk, M., Biecek, P., Polak, N., Cebrat, S. 2006. The relationships between the isoelectric point and: length of proteins, taxonomy and ecology of organisms. *BMC Genomics*, 8(1), 163. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-163>

Kyte J., Doolittle R. 1982. A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.

Lecker S., Goldberg A., Mitch W. 2006. Protein Degradation by the Ubiquitin–Proteasome Pathway in Normal and Disease State. *J Am Soc Nephrol* 17: 1807–1819, 2006. doi: 10.1681/ASN.2006010083

Lee D., Akao T., Yamashita S., Katayama H., Maeda M., Saitoh H., Mizuki E., Ohba M. 2000 Noninsecticidal Parasporal Proteins of a *Bacillus thuringiensis* Serovar *shandongiensis* Isolate Exhibit a preferential Cytotoxicity against Human Leukemic T Cells *Biochemical and Biophysical Research Communications* 272: 218–223

Lee D., Katayama H., Akao T., Maeda M., Tanaka R., Yamashita S., Saitoh H., Mizuki E., Ohba M. 2001 A 28 kDa protein of the *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongiensis* isolate 89-T-34-22 induces a human leukemic cell-specific cytotoxicity *Biochimica et Biophysica Acta* 1547: 57-63

Lucena, W. A., Pelegrini, P. B., Martins-de-Sa, D., Fonseca, F. C. A., Gomes, J. E., de Macedo, L. L. P., ... Grossi-de-Sa, M. F. (2014). Molecular approaches to improve the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Toxins*, 6(8), 2393–423. <https://doi.org/10.3390/toxins6082393>

Lehninger L., David L. Nelson, Michael M. Cox, Albert. 2006. Lehninger. Principios de Bioquímica. 4ta edición. Obtenido de <https://es.scribd.com/.../Lehninger-Principios-de-Bioquimica-Cuarta-Edicion-David-L...>

Mahalakshmi A., Shenbagarathai R. 2010. *In silico* structural analysis of parasporina-2 protein sequences of non-toxic *Bacillus thuringiensis* Journal of Biomedical Science and Engineering, 3:415-421

Manny M., Sot J., Goñi F. 2014. Interaction of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin with biological and models membranes: A putative proteins receptor in cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1848 (2015) 797-804.

Miyata S., Matsushita O., Minami J., Katayama S., Shimamoto S., Okabe A. 2001. Cleavage of a C-terminal Peptide Is Essential for Heptamerization of *Clostridium perfringens*  $\epsilon$ -Toxin in the Synaptosomal Membrane. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 276, No. 17, pp. 13778–13783

Mizuki E., Ohba M., Akao T., Yamashita S., Saitoh H., Park Y.S. 1999 Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: *in vitro* cell-killing action on human cancer cells, *Journal of Applied Microbiology*. 86: 477–486

Mizuki E., Park Y., Saitoh H., Yamashita S., Akao T., Higuchi K., Ohba M. 2000 Parasporin, a Human Leukemic Cell-Recognizing Parasporal Protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 7(4): 625-634.

Nadarajah VD, Ting D, Chang KK, Mohamed SM, Kanakeswary K, Lee HL. 2008. Selective cytotoxic activity against leukemic cell lines from mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* Parasporal inclusions. *The southeast Asia journal of tropical medicine and public health*. 39(2): 235-245.

Namba A., Yamagiwa M., Amano H., Akao T., Mizuki E., Ohba M., Sakai. 2003 The cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Coreanensis* A1519 strain against the human leukemic Tcell, *Biochemica et Biophysica Acta* 1622: 29-35

Ohba, M. and Aizawa, K. (1986) Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Japan. *Journal of Invertebrate Pathology*. 47:12–20.

Okumura S., Akao T., Higuchi K., Saitoh H., Mizuki E., Ohba M. Inouye K. 2004 *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongiensis* strain 89-T-34-22 produces multiple cytotoxic proteins with similar molecular masses against human cancer cells .*Applied Microbiology*. 39: 89–92

Okumura S., Saitoh S., Ishikawa T., Wasano N., Yamashita S., Kusumoto K., Akao T., Mizuki E., Ohba M., Inouye K. 2005 Identification of a Novel Cytotoxic Protein, Cry45Aa, from *Bacillus thuringiensis* A1470 and Its Selective Cytotoxic Activity against Various Mammalian Cell Lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, No. 16 6313-6318.

Okumura S., Saitoh H., Ishikawa T., Mizuki E. Inouye K. 2008. Identification and characterization of a novel cytotoxic protein, parasporin-4, produced by *Bacillus thuringiensis* A1470 strain. *Biotechnology Annual Review*. Vol 14 1387-2656

Okumura S., Saito H., Ishikawa T., Inouye K., Mizuki E. 2010 Mode of action of parasporin-4, a cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808:1476–1482

Okumura S, Ishikawa T, Saitoh H, Akao T, Mizuki E. 2013. Identification of a second cytotoxic protein produced by *Bacillus thuringiensis* A1470. *Biotechnology Letters* 35:1889–1894.

Okumura S, Koga H, Inouye K, Mizuki E. 2014. Toxicity of parasporin-4 and health effects of Pro-parasporin -4 diet in mice. *Toxins*. 6: 2115-2126.



Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Ruiz de Escudero I, Caballero P. Molecular and Insecticidal Characterization of a Novel Cry-Related Protein from *Bacillus Thuringiensis* Toxic against *Myzus persicae*. Barth H, ed. *Toxins*. 2014;6(11):3144-3156. doi:10.3390/toxins6113144.

Pigott C., Ellar D 2007 Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 71, No. 2 p. 255–281

Popoff M. 2011. Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin. *The Febs Journal*. Review article. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08145.x

Prasad S.S.S.V., Shethna Y.I., Aug. 1976, Mode of Action of a Purified Antitumor Protein from the Proteinaceous Crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* on Yoshida Ascites Sarcoma, *American Society for Microbiology*, Vol. 10, No. 2, p. 293-298

Sher, D., Fishman, Y., Zhang, M., Lebendiker, M., Gaathon, A., Mancheño, J. M., & Zlotkin, E. (2005). Hydralysins, a new category of  $\beta$ -pore-forming toxins in cnidaria. *Journal of Biological Chemistry*, 280(24), 22847–22855. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503242200>

Schnepf, E., Crickmore N., Van Rie, J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D. R., Dean D. H. Sept. 1998 *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins *Microbiology and Molecular Biology Reviews* Vol. 62, No. 3 p. 775–806

Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., & Peitsch, M. C. 2003. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3381–3385. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg520>

Uemori A., Maeda M., Yasutake K., Ohgushi A., Kagoshima K, Mizuki E., Ohba M. 2005 Characterization of Cancer Cell-Killing Activity Associated with Parasporal Proteins of Novel *Bacillus thuringiensis* Isolates, 6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its Environmental Impact

Uemori A., Ohgushi A., Yasutake K., Maeda M., Mizuki E., Ohba M. 2008 Parasporin-1Ab, a Novel *Bacillus thuringiensis* Cytotoxin Preferentially Active on Human Cancer Cells *In Vitro* Anticancer Research 28: 91-96

Varshavsky, A. 1997. The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 2(1), 13–28. [https://doi.org/10.1016/0309-1651\(90\)90142-L](https://doi.org/10.1016/0309-1651(90)90142-L)

Walker JM. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press .2005, 607p.

Wang, S., Li, W., Liu, S., & Xu, J. 2016. RaptorX-Property: a web server for protein structure property prediction. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W430–W435. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw306>

Xu L-N, Ling Y-H, Wang Y-Q, et al. Identification of differentially expressed microRNAs between *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab-resistant and -susceptible strains of *Ostrinia furnacalis*. *Scientific Reports*. 2015;5:15461. doi:10.1038/srep15461.

Yamashita S., Katayama H., Saitoh H., Akao T., Park Y., Mizuki E., Ohba M. Ito A. 2005 Typical Three-Domain Cry Proteins of *Bacillus thuringiensis* Strain A1462 Exhibit Cytocidal Activity on Limited Human Cancer Cells *The Japanese Biochemical Society* Vol. 138, No. 6, 138, 663–672

Yokoyama Y., Ohmori I. Kohda K., Kawazoe Y., 1988, Potentiation of the cytotoxic Activity of Anti-cancer Drugs against Cultured Cells by *Bacillus thuringiensis* subsp, *israelensis* Toxin, Vol.36 p. 4499 – 4504.

## 12. RESUMEN BIOGRÁFICO

Fátima del Carmen Reta Aldaba

Candidata para el grado de  
Maestro en Ciencias con orientación en Microbiología

Tesis: Predicción *in silico* de los dominios estructurales de las toxinas de PS2Aa1 y PS4Aa1 implicados en el modo de acción hacia células humanas anormales.

Campo de estudio: Biología molecular y Bioinformática.

Educación: Egresada en el 2006 de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Carrera: Químico Bacteriólogo Parasitólogo.

Experiencia profesional: Docente de la Universidad del Valle de México, de la carrera de QFBT. De 2012 a 2013.

Responsable del laboratorio de análisis Microbiológicos y fisicoquímicos en Sigma alimentos Lácteos. De 2008 a 2012.