

CARACTERIZACIÓN DE LAS PARASPORINAS (PS) PRESENTES EN *Bacillus thuringiensis* CEPAS IB84 Y GM18

Carlos Moreno-Peña, Jesús O. Medina-López, Luis J. Galán-Wong y Benito Pereyra-Alfárez, Instituto de Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán. Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, N. L., CP 66455 México. Correspondencia: bpereyra@gmail.com.

Palabras clave: Parasporina, IB84, GM18

Introducción. *Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria Gram positiva, facultativa y ubicua que se diferencia del resto de bacilos por sintetizar un cuerpo paraesporal de naturaleza proteica (cristal) (Kondo *et al.*, 2002). Las Parasporinas (PS) sintetizadas por Bt presentan actividad biológica específica contra algunos tipos de cáncer in vitro y tienen baja o nula actividad hacia células normales. Las PS muestran un espectro de actividad muy heterogéneo, modo de acción y secuencias aminoácidas entre las diferentes familias en las que se clasifican (Committee of Parasporin Classification and Nomenclature 2010). En el presente estudio identificamos la Parasporina presentes en nuestras cepas IB84 y GM18, con potencial en bioensayos en líneas celular de cáncer.

Metodología. Se analizaron 2 cepas pertenecientes a la colección de Instituto de Biotecnología FCB-UANL. Los cristales paraesporales de estas fueron purificadas (Mounsef *et al.*, 2014), y activadas con 10 µg/µl de proteinasa K (Sigma-Aldrich). Las proteínas fueron purificadas y las bandas con actividad citotóxica fueron sometidas a secuencia de aminoácidos en NANO LC-MS/MS y MALDI-TOF/TOF (Applied Biomics). La actividad biológica de las proteínas fue evaluada sobre la línea celular MOLT-4. Así mismo, determinamos la relación antigénica con PS1, PS2 y PS4 vía inmunodetección tipo "dot blot" con anti-GM18, antiPS1, anti-PS2 y anti-PS4. En base a los resultados de la secuencia de aminoácidos, diseñamos iniciadores para la amplificación genética tipo PCR.

Resultados: Los cristales de IB84 vistos al microscopio óptico tuvieron formas irregulares muy pequeñas, frecuentemente adheridos a uno de los polos de la espora y GM18 mostraban formaciones como de gotas de agua de tamaño medio. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los fragmentos trípticos del cristal de las cepas IB84 y GM18 tuvieron una homología del 100% con las prototoxinas de Cry15Aa de 38 kDa y Cry1Jb con 133 kDa, respectivamente.

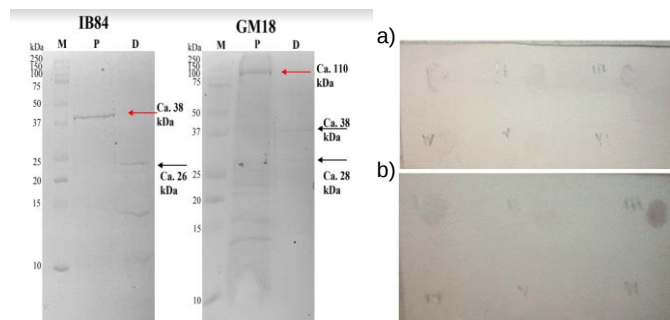


Figura 1. Perfiles de bandas de los cristales de la cepa IB84 y GM18. P, prototoxina; D, proteína activada

Figura 2. Dot Blots de proteínas con anticuerpos a) Anti-PS1 y b) Anti-PS4

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de los fragmentos trípticos del cristal de las cepas IB84 y GM18

Cepa	Secuencia del péptido	Sitio en la proteína	Dominio
IB84	K.SGVTVSASAK.F	96-107	II
	K.EHICHDQAEKYER.D	322-336	III
GM18	R.VTERFR.IIDAQIEANIPSFR.I	128-149	I
	R.TLSVESQNGR.C	772-783	Prototoxina

Conclusiones. A nivel de aminoácidos, fragmentos trípticos de las proteínas del cristal de las cepas IB84 y GM18 desplegaron 100 % de homología con las proteínas Cry15Aa y Cry1Ja, respectivamente. A diferencia de las proteínas Cry, nuestras cepas no son tóxicas contra los insectos que han sido probadas.

Agradecimientos. Al CONACYT Proyecto 106061.

Bibliografía

- Kondo S, Mizuki E, Akao T, Ohba M. (2002). Antitrichomonal strains of *Bacillus thuringiensis*. *Parasitology Research* 88:1090-1092.
- Okumura S *et al.* (2010) Parasporin nomenclature [Online]. Disponible en: <http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>
- Mounsef JR, *et al.* (2014) A simple method for the method for the separation of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. *Journal of Microbiological Methods* 107: 147-149.
- Espino A *et al.* (2012). Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains with cytotoxic activity against MOLT-4, a leukemia cell line. *Microbes in Applied Research: Current Advantages and Challenges*, 147
- Medina J (2014) . Purificación y caracterización de las parasporinas (PS) presentes en *Bacillus thuringiensis* cepas IB84 y GM18 Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, México