

Proteínas de *Bacillus thuringiensis* con actividad citotóxica: Parasporinas

Proteins of *Bacillus thuringiensis* with cytotoxic activity: Parasporins

Luisa-Fernanda Velásquez C.*, Danithza S. Rojas T.**, Jairo A. Cerón S.***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.73668

RESUMEN

Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) han sido reconocidas por su acción biocontroladora contra insectos plaga. Recientemente se ha descrito que algunas cepas de *Bt* codifican proteínas que no presentan actividad insecticida, pero al ser enfrentadas a líneas celulares de cáncer de diferentes tipos han demostrado actividad citotóxica. Estas proteínas han sido denominadas parasporinas (PS) y surgen como una potencial alternativa para el tratamiento del cáncer debido a que presentan citotoxicidad hacia diferentes líneas celulares cancerígenas y baja o nula citotoxicidad hacia células normales.

Palabras clave: Cáncer, línea celular, receptor, toxina Cry.

ABSTRACT

Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) have been recognized for their biocontrol action against insect pests. Recently it has been described some strains of *Bt* produce proteins without insecticidal activity, but when cancer cell lines of different types are exposed to these proteins they have demonstrated cytotoxic activity. These proteins have been called parasporins (PS) and are a potential alternative for the treatment of cancer because they have high cytotoxicity in different cancer cell lines, and null or low toxic activity in normal cells.

Key words: Cancer, cellular line, receptor, toxin Cry.

Recibido: julio 25 de 2018 **Aprobado:** noviembre 22 de 2018

INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es una bacteria Gram Positiva, aerobia, formadora de esporas y su proceso de esporulación se caracteriza por producir cristales paraesporales de origen protéico con propiedades insecticidas (Bravo *et al.*, 2005). La producción de dicho cristal está constituido por d-endotoxinas, clasificadas en dos grupos: toxinas Cry (Crystal) y toxinas Cyt (Cytolitic). La

presencia del cristal parasporal es el rasgo fenotípico de *Bt* con el cual se separa a esta bacteria de otras especies del género *Bacillus* (Vilas-Bôas *et al.*, 2007). El comité de nomenclatura de toxinas de *Bt* define a las toxinas Cry como d-endotoxinas que tienen similitud de secuencia primaria con las toxinas Cry reportadas y que presentan o actividad pesticida o algún efecto tóxico experimentalmente verificable hacia un organismo blanco (Crickmore *et al.*, 2014).

* Microbióloga Industrial. Msc. Biotecnología. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C, Colombia. lvelasquezc@unal.edu.co

** Microbióloga Industrial. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C, Colombia. dsrojas-to@unal.edu.co

*** Químico Farmacéutico. Msc. Biotecnología. PhD. Biotecnología. Instituto de Biotecnología. Edificio Manuel Ancizar (224) Universidad Nacional de Colombia. Calle 45 # 26-85. Bogotá D.C, Colombia. jacerons@unal.edu.co

De acuerdo al análisis filogenético realizado por el comité de nomenclatura de toxinas *Bt* (Crickmore *et al.*, 2014) a partir de las secuencias de proteínas, las toxinas Cry se clasifican en cuatro familias proteicas: 1. Las toxinas Cry de tres dominios (Cry-3d), es la familia que agrupa la mayoría de toxinas producidas por *Bt* y como su nombre lo indica se caracterizan por presentar tres dominios en su estructura; se han reconocido ampliamente por su actividad insecticida contra lepidópteros, coleópteros, dípteros entre otros órdenes de insectos (Adang *et al.*, 2014); 2. La familia ETX/MTX, relacionadas estructural y secuencialmente con la toxinas ETX de *Clostridium epsilon* y con la toxina mosquitocida MTX de *Lysinibacillus sphaericus* (Naimmov *et al.*, 2008); 3. La familia de las toxinas Bin (binarias), que incluye proteínas que de forma individual no exhiben efecto tóxico, pero sí al interactuar con otra proteína (Adang *et al.*, 2014) y 4. La familia de las toxinas Cyt que presentan actividad hemolítica (Soberón *et al.*, 2013). Así mismo, cepas de *Bt* también producen proteínas denominadas toxinas insecticidas Vip, producidas durante su crecimiento vegetativo. Se han identificado las Vip1, Vip2 y Vip3. (Bravo *et al.*, 2013).

Sin embargo, desde hace aproximadamente 19 años, investigaciones relacionadas con el aislamiento de cepas de *Bt* a partir de diversos nichos ecológicos, han revelado la producción de cristales parasporales que no presentan actividad hemolítica o insecticida (Periyasamy *et al.*, 2016), pero que a partir de la primera publicación realizada por Mizuki *et al.*, (2000) demostraron tener actividad anticancerígena con acción selectiva; es decir tienen actividad contra líneas celulares cancerosas y baja o nula actividad contra células sanas (Espino-Vázquez *et al.*, 2012). Dichas proteínas se denominaron Parasporinas (PS) y se han clasificado con base en la homología entre sus secuencias proteicas primarias, las cuáles indicaron que estructuralmente tienen semejanzas con las toxinas Cry de las familias Cry-3d, MTX y Bin (Krishnan, 2013). Hasta el momento se han identificado 19 PS y se han clasificado en seis niveles desde la PS-1 a la PS-6 (tabla 1) por el "Committee of Parasporin Classification and Nomenclature" (Okumura *et al.*, 2010).

De acuerdo a lo anterior, esta revisión pretende analizar reportes relacionados con proteínas activas contra líneas celulares de cáncer, producidas por *Bt*, debido a la importancia de encontrar nuevas formas de combatir el flagelo del cáncer. Este artículo pretende incentivar el estudio de las parasporinas en Colombia, país considerado megadiverso, a través del aislamiento y estudio de cepas nativas de *Bt*. La revisión describe las principales características de las parasporinas a la fecha identifica-

das, la actividad citotóxica que han presentado frente a algunas líneas celulares de cáncer y el aislamiento de cepas nativas de *Bt* productoras de toxinas PS.

CARACTERÍSTICAS DE LAS PROTEÍNAS PS

Como una de las principales características identificadas de PS, se resalta que en el cristal parasporal producido por *Bt*, se encuentran como protoxinas y para ser tóxicas primero deben ser solubilizadas a pH alcalino o ácido y posteriormente ser digeridas por serín proteasas, como la proteinasa K o la tripsina. Esto ha sido determinado mediante ensayos *in vitro* (electroforesis SDS-PAGE) y secuenciación aminoacídica (Mizuki *et al.*, 2000; Saitoh *et al.*, 2006; Ohba, *et al.*, 2009). En la tabla 1 se observa ésta característica proteica en la columna 5 y 6 en donde se resalta la masa relativa de la protoxina y de las toxinas, que en la mayoría de los casos están compuestas por más de un fragmento. Así mismo se indica el amplio uso de la tripsina y la proteinasa K como enzimas digestivas que determinan el tamaño del fragmento tóxico (Okomura *et al.*, 2010). A pesar de que algunas publicaciones resaltan el uso de otras enzimas, como la pepsina o la quimiotripsina, estas no han demostrado resultados significativos; ya que con la primera se determinó que la toxicidad frente a células MOLT-4 presentaba los mismo datos de mortalidad comparado con el uso de proteinasa K (Okomura *et al.*, 2004); y para la segunda, los fragmentos activos que generó no presentaron toxicidad frente a los cultivos celulares de cáncer evaluados (Mizuki *et al.*, 2000).

Para esta revisión se construyó un dendrograma con secuencias PS reportadas en GenBank con el respectivo número de acceso indicado en las etiquetas de cada terminal (figura 1). Se puede, en esta figura, observar la identidad entre las secuencias de aminoácidos de cada parasporina ya que con un mismo color se observa el agrupamiento por homología entre las PS y la baja homología entre cada grupo, lo cual sugiere que este tipo de proteínas son altamente heterogéneas (Ohba, *et al.*, 2009); incluso al compararlas con toxinas insecticidas (Cry3a y Cyt3), que se observan en color negro y sólo mostraron cercanía al ubicarse en un nodo cercano a PS3 y PS5 respectivamente. Las PS1 es el grupo de proteínas con más ejemplares identificados (rojo), todas relacionadas a partir de un mismo nodo.

Parasporina-1 (PS1)

La PS1Aa1 (Cry31Aa1) fue la primera toxina PS identificada. Como protoxina es un polipéptido de 81 kDa, cuya secuencia aminoacídica contiene los cinco bloques conservados, comúnmente descritos para las proteínas Cry insecticidas. Sin embargo, la identidad en la

Tabla 1. Clasificación y características de proteínas PS. (---) No determinado. (García 2016; Okomura *et al.*, 2013).

Parasporina	Nomenclatura Cry	Cepa <i>Bt</i>	Gen (pb)	Pro-toxina (kDa)	Fragmentos tóxicos (kDa)	Proteasa	País	Referencia
PS1Aa1	Cry31Aa1	84HS-1-11	2,169	81	66,58,56	Tripsina	Japón, Estados Unidos	(Mizuki <i>et al.</i> , 2000)
PS1Aa2	Cry31Aa2	M15	2,226	83	55, 70	Tripsina	Canadá	(Jung <i>et al.</i> , 2007)
PS1Aa3	Cry31Aa3	B195	2,169	81	56	Tripsina	Japón	(Uemori <i>et al.</i> , 2008)
PS1Aa4	Cry31Aa4	Bt79-25	2,169	81	---	Proteinasa K	Vietnam	(Yasutake <i>et al.</i> , 2008)
PS1Aa5	Cry31Aa5	Bt92-10	2,169	81	---	Proteinasa K	Vietnam	(Yasutake <i>et al.</i> , 2008)
PS1Aa6	Cry31Aa6	64-1-94, M15, M019	2,262	70	15 y 55	Tripsina	Japón, Caribe, Canadá.	(Nagamatsu <i>et al.</i> , 2010)
PS1Ab1	Cry31Ab1	B195	2,178	82	56	Tripsina	Japón	(Uemori <i>et al.</i> , 2008)
PS1Ab2	Cry31Ab2	Bt-31-5	2,178	82	---	Proteinasa K	Vietnam	(Yasutake <i>et al.</i> , 2008)
PS1Ac1	Cry31Ac1	Bt-87-29	2,331	87	---	Proteinasa K	Vietnam	(Yasutake <i>et al.</i> , 2008)
PS1Ac2	Cry31Ac2	B0462	2,331	87	15 y 607445	Proteinasa K	Japón	(Kuroda <i>et al.</i> , 2013 - No publicado; Kuroda <i>et al.</i> , 2013)
PS1Ad1	Cry31Ad1	64-1-94, M15, M019	2,262	73	14 y 59	Tripsina	Japón, Caribe, Canadá.	(Nagamatsu <i>et al.</i> , 2010)
PS2Aa1	Cry46Aa1	A1547, 4R2	1,014	37	30	Proteinasa K	Japón, Estados Unidos.	(Ito <i>et al.</i> , 2004)
PS2Aa2	Cry31Aa2	A1470	1,011	37	---	---	Japón	(Ishikawa <i>et al.</i> , 2008 2013 - No publicado)
PS2Ab1	Cry31Ab1	TK-E6	912	33	29	Proteinasa K	Japón	(Hayakawa <i>et al.</i> , 2007)
PS3Aa1	Cry41Aa1	A1462	2,475	88	64	Proteinasa K	Japón	(Yamashita <i>et al.</i> , 2005)
PS3Ab1	Cry41Ab1	A1462	2,487	70	---	Tripsina	Japón	(Nagamatsu <i>et al.</i> , 2010)
PS4Aa1	Cry45Aa1	A1470, T98+	2,487	30	26.8	Pepsina ó Proteinasa K	Japón	(Okomura <i>et al.</i> , 2004)
PS5Aa1	Cry64Aa1	A1100	918	33	30	Proteinasa K	Japón	(Ekino <i>et al.</i> , 2014)
PS6Aa1	Cry63Aa1	64-1-94, M15, 1019	2,259	85	14 y 59	Tripsina	Japón, Caribe, Canadá.	(Nagamatsu <i>et al.</i> , 2010)

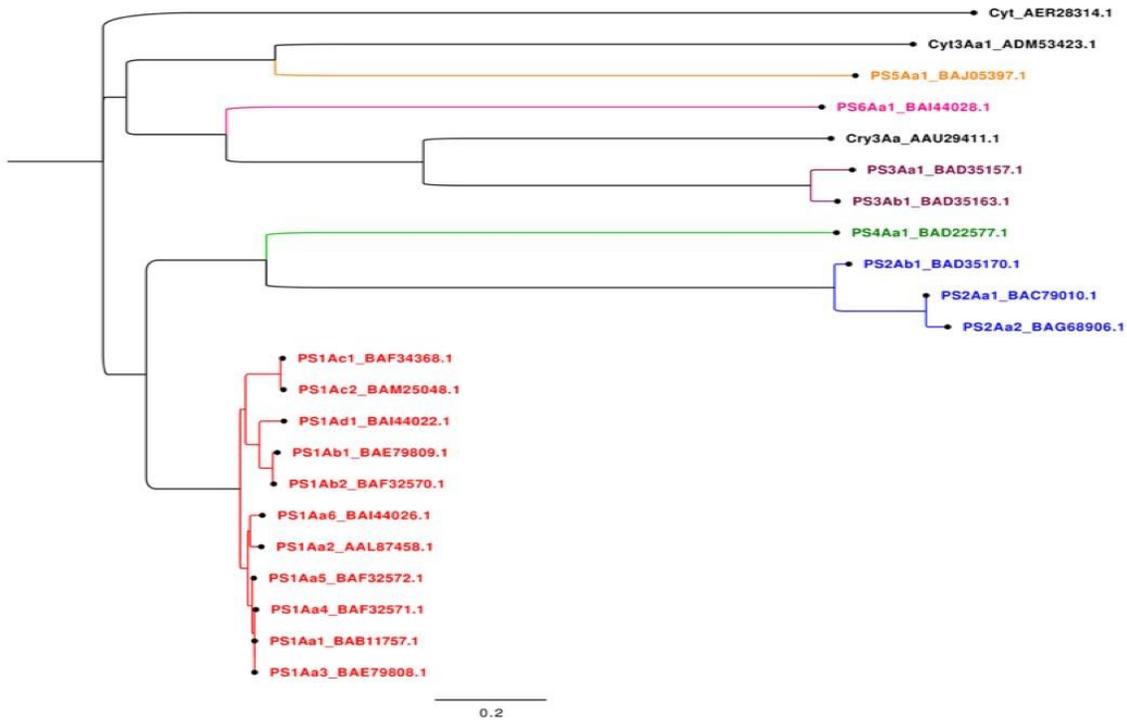


Figura 1. Dendrograma construido con el software Geneious y con Figtree (v1.4.3) usando el algoritmo Neighbor Joining, a partir del alineamiento (clustal W) de secuencias de aminoácidos de PS reportadas en GenBank. En color rojo se indica el grupo PS1, en azul el grupo PS2, en morado el grupo PS3, en verde el grupo PS4, en naranja el grupo PS5 y en rosa el grupo PS6. En negro se observan secuencias de toxinas insecticidas (Cry3Aa y Cyt3Aa).

secuencia de aminoácidos de PS1Aa1 con respecto a las proteínas Cry y Cyt bioinsecticidas es menos del (<25 %) (Ohba, *et al.*, 2009). De acuerdo a la presencia de los bloques conservados se infiere que la estructura de estas toxinas es característica de los tres dominios de proteínas Cry (Adang *et al.*, 2014).

Estudios de Katayama *et al.*, (2005) con la cepa A1190 de *Bt* que produce PS1Aa1 (Mizuki *et al.* 2000) determinaron que la digestión de la protoxina a diferentes concentraciones de proteinasa K y tripsina es responsable de la actividad tóxica frente a células HeLa (cáncer de cuello uterino humano) y HL60 (células de leucemia mieloide), mediante ensayos de viabilidad celular utilizando MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). En dicho ensayo se observó mayor actividad cuando la protoxina fue tratada con tripsina (50% DL50), ya que de esta forma fueron identificados tres péptidos, dos de ellos tóxicos: uno pequeño de 15 kDa y otro de 56 kDa. Estos dos fragmentos fueron separados e identificados mediante cromatografía en columna (Superdex 75) y SDS-PAGE, encontrándose que los dos fragmentos formaban un heterodímero difícil de disociar en presencia de detergentes o agentes desnaturizantes débiles, por lo que los autores sugirieron que este heterodímero compone el fragmento tóxico de la PS1Aa1. Para PS1Aa2 (Cry31Aa2) se realizaron pruebas similares en donde se concluyó que solo la digestión con tripsina generó el fragmento tóxico a pesar de ser también tratada con quimotripsina y proteinasa K. (Jung *et al.*, 2007)

Se ha identificado que las PS1 ejercen efectos citotóxicos altos contra ciertas líneas celulares como las tipo HeLa (Ito *et al.*, 2004), MOLT-4 (leucemia de células T) (Katayama *et al.*, 2007) y HL60 (Kitada *et al.*, 2006). También efecto citotóxico moderado hacia células Sawano (células de cáncer endometrial) and HepG2 (células de cáncer de hígado) y nula actividad tóxica contra células T obtenidas de tejidos normales y líneas celulares MRC-5. Dicha actividad selectiva sugiere el reconocimiento de un receptor específico entre el fragmento tóxico PS1 y las células blanco. Katayama *et al.* (2011) identificaron y patentaron la molécula beclina-1 como receptor de PS1Aa1; indicando que este receptor es una proteína que en células normales actúa intracelularmente en procesos como la autofagia y apoptosis, pero en las células HeLa está localizada de forma extracelular (Zhong *et al.* 2009).

Parasporina-2 (PS2)

Dos de las principales PS2 son producidas por las cepas *Bt* A1547 (PS2Aa1) y A1470 (PS2Aa2). Son proteínas

de 37 kDa como protoxina (Kitada *et al.*, 2006), y se diferencian entre ellas en tan solo cuatro residuos de aminoácidos. Dichas protoxinas al ser cortadas por proteasas por los extremos amino y carboxilo terminal, se genera un fragmento tóxico de aproximadamente 30 kD (Okumura *et al.*, 2013). Esta proteína ha mostrado citotoxicidad frente a líneas celulares como HepG2 (cáncer de hígado), Jurkat (leucemia de linfocitos T) y poca actividad hacia células HeLa y hepatocitos normales (Ito *et al.*, 2004).

La PS2Aa1 (Cry46Aa1) es un polipéptido de 338 residuos de aminoácidos. Ésta parasporina no presenta estructura de los tres dominios típicos de las proteínas Cry insecticidas ya que los resultados obtenidos de alineamientos, únicamente presentó identidad de tan solo 23.5% con Cry15Aa (Ito *et al.* 2004). Es importante señalar que la proteína Cry15Aa tiene alta identidad con toxinas mosquitocidas (Mtx2 y Mtx3) de *Bacillus sphaericus* (de Maagd *et al.*, 2003); a las cuales se les ha reconocido su similitud con la toxina aerolisina de *Aeromonas hydrophila*, toxina bacteriana reconocida como β -formadora de poros (TFP) (Akiba *et al.*, 2009). Esto sugiere un posible mecanismo de acción poro formador para este tipo de toxinas.

A la fecha, la única PS con estructura definida por difracción de rayos x es la PS2Aa1 (PDB:2ZTB). Se identificó que la toxina está conformada principalmente por hojas β , que se enrollan y alargan sobre el eje de la molécula; estructura similar a la toxina aerolisina TFP (Akiba *et al.*, 2009).

Tal y como se observa en la figura 2, el dominio 1 (D1) de la PS2 (A) está compuesto por cuatro α -hélices cortas y cuatro hojas β pequeñas antiparalelas. La α -hélice uno (1) limita con el dominio 2 (D2), mientras la hélice dos (2) y tres (3) forman el sándwich de la hoja β . El dominio 1 es rico en residuos aromáticos expuestos (fenilalanina, triptófano y tirosina) que sugieren un posible sitio de unión de PS2 a células cancerígenas susceptibles (Akiba *et al.*, 2009). El dominio 2 es un dominio β -sándwich (4) y una hoja β de cinco (5) hojas antiparalelas (recuadro rojo indica las hojas β). En la interface del dominio 2 y 3, la quinta hoja β esta reorganizada dentro de dos y tres hojas antiparalelas. Estas dos hojas β forman un β -sandwich que constituyen el dominio 3 (D3) (Akiba *et al.*, 2009).

En la figura 2 se observa que las PS2 comparten una similitud estructural notable con la toxina Epsilon (ETX) (B) y la aerolisinas tipo β (C), las cuales son reconocidas como proteínas TFP. En el dominio 2 de cada toxinas,

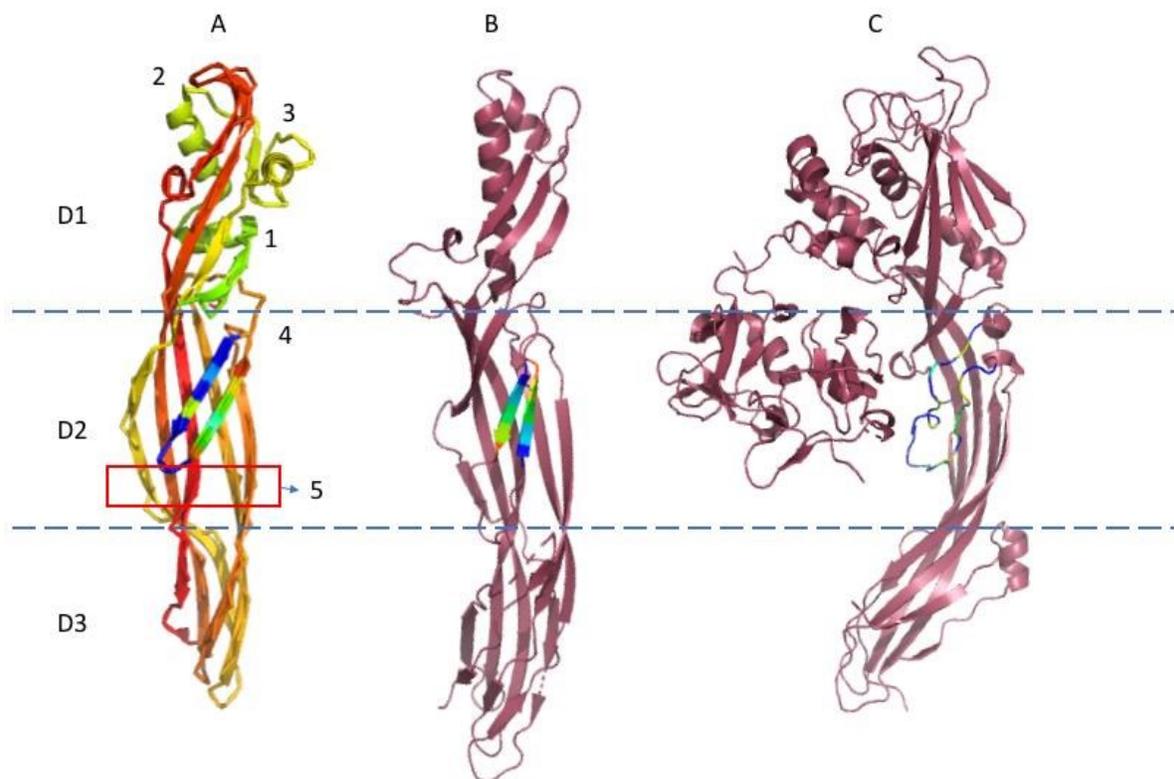


Figura 2. Estructuras tridimensionales de las toxinas A) PS2Aa1 (PDB:2ZTB), B) Epsilon de *Clostridium perfringens* (ETX) (PDB:1UYJ) y C) Aerolisina de *Aeromonas hydrophila* (PDB: 1PRE). Imagen diseñada en el software PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC). La línea punteada indica los límites de cada dominio, en donde D1 corresponde al dominio 1, D2 al dominio 2 y D3 al dominio 3. Los números de 1 al 5 indican formaciones estructurales alfa y beta de la toxina.

resaltado por una gama de colores, se observa la zona anfipática que presenta cada toxina, se sugiere que estos bucles son responsables de la formación de poro sobre membranas celulares (Xu *et al.*, 2014)

A pesar de lo mostrado anteriormente, aún no se ha determinado un modelo completo del mecanismo de acción de las PS2. Recientemente y con base al análisis de unión entre las toxinas y las membranas celulares, Abe *et al.*, (2008) propusieron que las PS2 son capaces de producir procesos de oligomerización, que a su vez inducen muerte celular al unirse a zonas ricas en lípidos de membrana como las balsas lipídicas. Esto se determinó, eliminando el colesterol en las membranas de líneas celulares cancerígenas y se observó disminución de la formación de oligómeros y por lo tanto una disminución en la muerte celular. Es importante resaltar que para muchas de las toxinas Cry insecticidas se les han reconocido receptores protéicos presentes en balsas lipídicas, como las aminopeptidasas o fosfatasa alcalinas, proteínas con anclaje a GPI (glucosil-fosfatidil-

inositol) (Bravo, *et al.* 2013); esto puede indicar que proteínas receptoras de este tipo inducen o provocan la actividad de las toxinas, conservando el patrón de las proteínas producidas por Bt a las cuales ya se les ha reconocido un mecanismo de acción.

Recientemente, Abe *et al.*, (2017) reportaron nuevos datos que indican un posible rol de las proteínas con anclaje GPI en el mecanismo de acción de toxinas PS2. En líneas celulares CHO (cáncer de ovario en hámster), se observó que el glicano presente en proteínas GPI induce procesos de oligomerización en toxinas PS2, ya que en ausencia de dicho glicano no se observó ni unión, ni oligomerización, ni citotoxicidad. Sin embargo, se determinó también que proteínas GPI se encuentran presentes en células resistentes a PS2; lo cual sugiere que estas proteínas de membrana no determinan la especificidad de toxinas PS2, pero si presenta una función de correceptor en la acción tóxica. Respecto al mecanismo de muerte celular generado por estas PS, se ha propuesto la inducción de la apop-

tosis con la identificación de diversas inhibiciones de la vía de supervivencia que incluyen AKT, XIAP, ERK1 / 2 y la inducción del supresor tumoral PAR-4 después del tratamiento con PS2Aa1. También se ha determinado que la inhibición de la vía Pi3K / AKT, en combinación con la toxina aumenta, de manera sinérgica la eficacia de PS2Aa1 para inducir mecanismo de acción para este grupo de PS; se ha observado que la secuencia del carboxilo terminal de PS3Aa1 es similar a la hemaglutinina HA-33 de *Clostridium botulinum* (Tsuzuki *et al.*, 1990) toxina bacteriana reconocida como formadora de complejos que inducen respuesta inmunitaria en las células (Carruthers & Carruthers., 2018); lo cual puede dar leves indicios de cómo puede actuar dicha toxina.

Respecto a la muerte celular inducida por las PS3, se ha planteado la hipótesis de que producen muerte necrótica por la formación de poros en la membrana plasmática de las células cancerígenas, como evidencia de lo anterior, en ensayos *in vitro* se ha observado que PS3Aa1 aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática de las células diana y tiene una progresiva liberación de LDH (lactato deshidrogenasa), que fue inversamente proporcional a la tasa de sobrevivencia de células HepG2 (Ohba, *et al.*, 2009).

Parasporina-4 (PS4)

La PS4 es una proteína citotóxica que presenta homología de secuencias con la toxina Épsilon (ETX) (21%) y con la toxina Aerolisina (10%), similar a lo observado en el grupo PS2. Aunque existen reportadas tres secuencias nucleotídicas en GenBank (AB180980.1; KC832500.1; KC832499.1), solo una ha sido descrita y caracterizada. Esta corresponde a la PS4Aa1 producida por la cepa A1470, proteína de 30 kDa en su forma nativa y de 27 kDa en su forma tóxica al ser digerida con proteinasa K (Okumura *et al.*, 2004). La proteína activa presenta una fuerte actividad citotóxica contra líneas celulares humanas con cáncer como MOLT-4, CACO-2 (cáncer humano de colon), TCS (cáncer humano de cuello uterino), y células HL60 (Chengchen *et al.*, 2014). Esta parasporina no posee ni bloques conservados, ni estructura típica de Cry-3d insecticidas (Okumura *et al.*, 2006). La PS4 es la única parasporina que ha sido solubilizada a pH ácido, ya que tras ser solubilizada en HCl 10 mmol, se observó un incremento del 25% en su efecto citotóxico hacia varias líneas celulares, en comparación a su actividad tras la solubilización en buffer de carbonatos. También se ha visto que puede ser activada tanto con proteinasa K como con Pepsina (Okumura *et al.*, 2008).

En cuanto al mecanismo de acción de la PS4 se conoce que el tratamiento con esta PS, provoca inflamación y

lisis de las células cancerígenas 24 horas después de la aplicación; esta parasporina se une inespecíficamente a la membrana plasmática, formando un complejo de poro oligomérico en las células blanco (Xu *et al.*, 2014). Así mismo, se han realizado ensayos que permitieron medir la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) y la internalización de dextranos de diferentes pesos moleculares, observándose la permeabilización de la membrana de células MOLT-4 y baja activación de las caspasas afectoras 3/7, sugiriendo que el mecanismo de muerte celular puede ser necrosis (Okumura *et al.*, 2011).

Parasporina-5 (PS5)

La PS5 (Cry64Aa) es la única de esta clase reconocida a la fecha por el comité de nomenclatura de PS; fue aislada y purificada de la cepa A1100 de *Bt tohokuensis* por Ekino *et al.*, (2014) y presenta actividad citotóxica contra células T humanas con leucemia (MOLT-4). Esta parasporina presenta una masa molecular de 33.8 kDa en su forma de protoxina, pero cuando es cortada por proteinasa K se produce un fragmento activo de 29.8 kDa. La PS5 no muestra una significativa identidad ni con otros grupos de parasporinas, ni con proteínas Cry insecticidas sin embargo, presenta similitud de secuencias con Aerolisinas β -formadoras de poros (β -TFPs) al realizar la predicción de un dominio conservado, con secuencia similar al de la toxina épsilon, causante de la formación de canales en la membrana lipídica de las células. (Ekino *et al.*, 2014). Existen pocos reportes y poca identificación de estas PS, por ello se conoce muy poco sobre el mecanismo de acción y su espectro citotóxico.

El reporte más reciente de PS5 lo realizó Ammons *et al.*, (2016) en donde aislaron 10 cepas de *Bt* de muestras de estiércol de ganado vacuno, en la Isla caribeña Trinidad; de éstas, se identificaron dos PS5 en 5 cepas. En el estudio fueron denominadas como PS5-1 Y PS5-2 y tienen, respecto a la PS5Aa1, una identidad de 41% y 45% respectivamente.

Parasporina-6 (PS6)

La PS6 (Cry63Aa) se aisló de las cepas de *Bt* M109 y CP84 (Nagamatsu *et al.*, 2010). Las protoxinas de las PS1 y PS6 están relacionadas entre sí en algunos aspectos ya que comparten secuencias conservadas en sus primeros 50 residuos de aminoácidos. Además, tras ser activadas por proteólisis, dos de tres péptidos generados en el proceso, conforman un heterodímero tóxico (Lenina *et al.*, 2014).

Análisis realizados a la secuencia de aminoácidos de la PS6 sugieren que es una toxina Cry de tres dominios,

que presenta 56.4% de identidad con las proteínas insecticidas Cry2 (Chengchen *et al.*, 2014). La PS6 presenta mayor actividad citotóxica hacia células HepG2 y HeLa (Nagamatsu *et al.*, 2010); desafortunadamente no se ha investigado mucho sobre esta parasporina, por ende se conoce poco sobre su mecanismo de acción y efecto citotóxico.

ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE PS *IN VITRO*

Cada parasporina estudiada ha presentado efecto citotóxico preferencial hacia cierto tipo de línea celular, más que por un tipo de cáncer en particular. En la tabla 2 se resumen datos específicos de pruebas de toxicidad reportadas entre parasporinas y líneas celulares cancerígenas. Con estos datos, se puede observar que las líneas celulares más afectadas, a menor concentración, por las proteínas PS son las HL-60 y HepG2; que adicionalmente son afectadas por casi todas las toxinas.

Es importante resaltar que el mejor tratamiento frente a este tipo de células, es aquel con el cual una menor concentración de toxina logre mayor actividad tóxica; según esto, los mejores resultados están representados para la toxicidad de las células HeLa por la PS1, células HepG2 y Sawano por la PS2, células tipo Sawano por la PS4 y una actividad tóxica relevante de la PS5 sobre más de una línea celular cancerígena a concentraciones por debajo de los 0,2 ug/mL de toxina activada (Caron *et al.*, 2012). Sin embargo, a pesar de que las PS5 presentan buena toxicidad frente a células cancerígenas de cérvix (HeLa, TCS) también presenta una importante actividad sobre células normales (UtSMC), lo cual sugiere una necesidad de más estudios con esta parasporina para determinar su funcionalidad para un posible tratamiento de cáncer de este tipo.

Finalmente es relevante observar que, en la mayoría de los casos, se necesita una alta concentración de las toxinas para afectar células normales, lo cual cumple con la definición básica de las parasporinas respecto a generar bajo o nula actividad a dichas células y demuestra una de las principales ventajas de este tipo de moléculas como anticancerígenas (Chubicka *et al.*, 2018).

IDENTIFICACIÓN DE PS EN CEPAS NATIVAS DE *Bt*

Las PS se han encontrado en diferentes ecosistemas mundiales y han sido identificadas a través de diferentes métodos. Antes de 1999, el aislamiento de cepas nativas de *Bt* tenía como principal objetivo la búsqueda de proteínas insecticidas. Sin embargo, con la publicación de Mizuki *et al.*, (2000), en donde a partir de cepas de *Bt* (colección del Instituto de Control Biológico de la Universidad de Kyush - Japón) se identificaron las pri-

meras PS activas contra la línea celular cancerígena Molt-4 y surgió el interés en la búsqueda e identificación de proteínas PS a partir de cepas nativas.

Investigaciones relacionadas con el aislamiento de cepas *Bt* productoras de PS se han realizado a partir del muestreo de insectos plaga muertos, denominados ácaros de dos puntos (*Tetranychus urticae*) en Canadá (Jung *et al.*, 2007) y de muestras de suelos en Japón (Uemori *et al.*, 2007; Uemori *et al.*, 2008), Vietnam (Yasutake *et al.*, 2006; Yasutake *et al.*, 2008), India (Poornima *et al.*, 2010; Lenina *et al.*, 2014; Periyasamy *et al.*, 2016; Chubicka *et al.*, 2018), México (Espino-Vázquez *et al.*, 2012), Isla Trinidad, Caribe (Gonzalez *et al.*, 2011; Ammons *et al.*, 2016) e Irán (Moazmian *et al.*, 2018).

En publicaciones más recientes, el principal método utilizado para la identificación de genes *ps* se ha basado en el diseño de oligonucleótidos a partir de genes de referencia reportados y reconocidos por el Comité de Nomenclatura de Parasporinas PS (Okomura *et al.*, 2010); extracción de DNA a las cepas *Bt* previamente identificadas y la amplificación de los genes por PCR (Espino-Vázquez *et al.*, 2012; Lenina *et al.*, 2014; Ammons *et al.*, 2016; Chubicka *et al.*, 2018). Dicho proceso, contrasta con publicaciones anteriores al 2012, en las cuales realizaron, como etapa inicial, pruebas de citotoxicidad sobre líneas celulares cancerígenas y así observaron su afectación a causa de la actividad que sobre ellas efectuaron inclusiones parasporales de *Bt* previamente solubilizadas a pH básico y activadas con serín proteasas. A partir de los resultados de mortalidad celular se infería la presencia de PS, para posteriormente aplicar métodos moleculares de expresión, secuenciación de proteínas y DNA para la identificación de genes *ps* (Mizuki *et al.*, 2000; Yasutake *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2007; Uemori *et al.*, 2007; Yasutake *et al.*, 2008; Poornima *et al.*, 2010; Gonzalez *et al.*, 2011). Lo anterior indica que el cambio en la técnica de identificación ha variado de acuerdo con el nivel de información de la secuencia de genes *ps* que se ha logrado adquirir a través del tiempo.

Como se mencionó en la introducción de esta revisión, para que estas proteínas sean reconocidas como PS, no deben presentar actividad ni hemolítica, ni insecticida (Periyasamy *et al.*, 2016); razón por la cual la mayoría de investigaciones llevan a cabo pruebas hemolíticas con eritrocitos de humanos (Chubicka *et al.*, 2018) o de oveja (Uemori *et al.*, 2007) y bioensayos con larvas de insectos plaga reconocidos por su susceptibilidad a toxinas Cry (*Bombix mori*, *Spodoptera litura*, *Plutella*

Tabla 2. Actividad citotóxica de PS; Los guiones (--) indican datos no determinados. Basado en: Krishnan *et al.*, 2010; Okassov *et al.*, 2015; García 2016.

Líneas celulares humanas	PS1 - CL ₅₀ µg/ml	PS2 - CL ₅₀ µg/ml	PS3 - CL ₅₀ µg/ml	PS4 - CL ₅₀ µg/ml	PS5 - CL ₅₀ µg/ml	PS6 - CL ₅₀ µg/ml
MOLT-4 (Leucemia)	2,2	0,022	>10	0,472	0,075	--
Jurkat (Leucemia)	>10	0,018	>10	>2	0,124	--
HL-60 (Leucemia)	0,32	0,019	1,32	0,725	1,079	--
U937 DE-4 (Leucemia)	--	--	--	0,980	>10	--
K562 (Leucemia)	--	--	--	>2	4,249	--
HepG2 (Cáncer hepático)	3,0	0,019	2,8	1,90	0,049	2,3
HeLa (Cáncer cervical)	0,12	2,5	>10	>2	0,08	7,2
Sawano (Cáncer endometrial)	>10	0,0017	>10	0,245	0,065	--
TCS (Cáncer cervical)	--	>2	>10	0,719	0,046	--
Caco-2 (Cáncer de colon)	>10	0,013	>10	0,124	0,30	>10
A549 (Cáncer pulmonar)	>10	>10	>10	>2	>2	--
T (normales)	>10	0,148	>10	>2	--	--
HC (Hepatocitos normales)	>10	1,1	>10	>2	>10	>10
UtSMC (Útero normales)	>10	>2	>10	>2	0,223	--
MRC-5 (Pulmón normales)	>10	>2	>10	>2	0,273	--

xilostella, *Aedes aegypti*) (Uemori *et al.*, 2007). Usualmente, aquellas cepas que expresan PS no presentan hemólisis o actividad insecticida (Chubicka *et al.*, 2018), pero cuando se presenta algún nivel de dicha toxicidad, las cepas nativas deberían ser descartada como productoras de toxinas PS (Lenina *et al.*, 2014). Sin embargo, si dicha cepa tiene presente en su código genético un gen *ps*, sería necesario realizar pruebas citolíticas frente a líneas celulares de cáncer, ya que a través de técnicas moleculares podría ser extraído el gen, clonado y expresado en cepas Bt acristalíferas que expresen únicamente el gen *ps* de interés (Jung *et al.*, 2007). Lo anterior debido a que en una inclusión parasporal de Bt, puede estar presente más de una delta-endotoxina, con lo cual la hemólisis o la actividad insecticida la puede estar llevando a cabo alguna toxina Cyt o Cry y no la PS (Charles *et al.*, 2001; Yasutake *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

El cáncer es una de las principales causas de muerte en humanos en todo el mundo, por lo que los retos actuales son la búsqueda de nuevos tratamientos (Brome-Bohorquez *et al.*, 2018). Es así como las proteínas PS, producidas por la bacteria Bt, identificadas desde hace 20 años por su actividad tóxica (*in vitro*) frente a líneas celulares cancerígenas, han cobrado importancia a pesar de que el número de estudios son pocos, en com-

paración con los estudios de proteínas Cry insecticidas producidas por la misma bacteria, con un desarrollo académico y comercial de más de 40 años. Al realizar una búsqueda, herramientas bibliográficas como SCOPUS y PUBMED (2018), utilizando únicamente la palabra "parasporin" se encuentran 50 publicaciones. Si se realiza este mismo ejercicio utilizando las palabras "Cry and toxin" se obtienen 1218 publicaciones.

Una de las principales limitaciones en este nuevo campo de acción es el desconocimiento, a nivel molecular, de dichas toxinas ya que como se observó en la descripción de cada PS, aún no se han establecido receptores de unión a células cancerígenas, ni se ha establecido un modelo con evidencia experimental del mecanismos de acción; únicamente se han sugerido modelos basados en la estructura de una sola parasporina (PS2) y la identidad en secuencia de aminoácidos que presentan las seis PS, comparando lo obtenido con lo ya determinado para toxinas Cry insecticidas. Hasta que estos aspectos no se hayan dilucidado con mayor profundidad, no será posible avanzar en estudios a nivel *in vivo*; los cuales son decisivos para adelantar las pruebas clínicas que determinen la seguridad y eficacia así como la posible formulación de un producto que sea realmente funcional para el consumo humano.

A la fecha solo se ha reportado un estudio *in vivo*, realizado por Okomura *et al.*, 2014, en el que se utilizaron

ratones de las cepas ICR y C57BL/6J para determinar los efectos que pueden generar en la salud la aplicación de PS4, en forma de protoxina, vía oral y subcutánea. No se llevaron a cabo pruebas en ratones que presentaran síntomas de cáncer. La conclusión a la que llegaron los investigadores, por medio de la medición DL₅₀ y monitoreo de tejidos del riñón e intestino post mortem, después de 48 días de suministro de la PS, es que no se observaron efectos significativos sobre la salud los ratones, a pesar de evidenciar ligero daño en los túmulos renales. Así mismo determinaron que en el intestino se presentaron procesos de solubilización y activación de la PS4. Estos resultados son importantes para un futuro producto a base de PS4, pero no indica su efecto citotóxico. Tomando en consideración que solamente existe una publicación al respecto, es evidente el largo camino de investigación que aún le falta por recorrer a este campo de acción.

A pesar de dichas limitaciones es importante seguir considerando este tipo de compuestos biológicos, los cuales representan un prometedor y largo camino en el campo de la salud, mucho más para un país como Colombia, caracterizado por ser un país megabiodiverso y por lo tanto podría fortalecer la búsqueda de nuevas cepas nativas, que presenten potencialidad para el aislamiento e identificación de genes que codifiquen este tipo de proteínas, especialmente cuando el grupo de Biopesticidas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, ha aislado e identificado cepas nativas de *Bt*, a las cuales aún no se les ha reconocido actividad insecticida (Uribe *et al.*, 2003).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Abe, Y; Inoue, H; Ashida, H; Maeda, Y; Kinoshita, T; & Kitada, S. (2017). Glycan region of GPI anchored-protein is required for cytotoxic oligomerization of an anticancer parasporin-2, Cry46Aa1 protein, from *Bacillus thuringiensis* strain A1547. *Journal of Invertebrate Pathology*, 142,71-81.
- Adang, M; Crickmore, N; & Jurat-Fuentes, JL. (2014). Diversity de *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxins and Mechanism of Action. Chapter two In: Insect midgut and insecticidal proteins, volumen 47. p. 39-87.
- Akiba, T; Abe, Y; Kitada, S; Kusaka, Y; Ito, A; Ichimatsu, T; Katayama, H; Akao, T; Higuchi, K; Mizuki, E; Ohba, M; Kanai, R; & Harata, K. (2009). Crystal Structure of the Parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* Toxin That Recognizes Cancer Cells. *Journal of Molecular Biology*, 386,121-133.
- Ammons, DR; Short, JD; Bailey, J; Hinojosa, G; Tavarez, L; Salazar, M; & Rampersad, JN. (2016). Anti-cancer parasporin toxins are associated with different environments: discovery of two novel parasporin 5-like genes. *Current Microbiology*, 72(2):184-189.
- Brasseur, K; Auger, P; Asselin, E; Parent, S; Côté, JC; & Sirois, M. (2015). Parasporin-2 from a new *Bacillus thuringiensis* 4R2 strain induces caspases activation and apoptosis in human cancer cells. *PLoS ONE*, 10 (8), e0135106.
- Bravo, A; Gill, SS; & Soberón, M. (2005). *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: Comprehensive molecular insect science. Elsevier B.V. p. 175-206.
- Bravo, A; Gómez, I; Porta, H; García-Gómez, B; Rodríguez-Almanza, C; Pardo, L; & Soberón, M. (2013). Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. Minireview. *Microb Biotechnol*, 6(1): 17-26.
- Brome-Bohorquez, MR; Montoya, DM; & Salcedo, LA. (2018). Incidencia y mortalidad por cáncer en Medellín, Colombia. 2010-2014. *Colombia Médica*, 49 (1), 82-88
- Caron, WP; Song, G; Rawal, S; & Zamboni, SWC. (2012). Interpatient Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Variability of Carrier-Mediated Anticancer Agents. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 91(5), 802-812.
- Carruthers, A; & Carruthers, J. (2018). Toxina botulínica. 4th edition. España. Elsevier Health Science. p.12
- Charles, JF; Delécluse, A; & Nielson-LeRoux, C. (2013). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Kluwer Academic. Dordrecht. p.1-22. <https://www.springer.com/us/book/9780792365235>
- Chengchen, X; Bi-cheng, W; & Ming, S. (2014). Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins. *Toxins*, 6(9), 2732-2770.

- Chubicka, T; Girija, D; Deepa, K; Salini, S; Meera, N; Raghavamenon AC; Divya, MK; & Babu, TD. (2018). A parasporin from *Bacillus thuringiensis* native to peninsular India induces apoptosis in cancer cells through intrinsic pathway. *Journal of Biosciences*, 43 (2), 407-416.
- Crickmore, N; Baum, J; Bravo, A; Lereclus, D; Narva, K; Sampson, K; Schnepf, E; Sun, M; & Zeigler, D.R. (2015). *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/.
- de Maagd, R; Bravo, A; Berry, C; Crickmore, N; & Schnepf, E. (2003). Structure, Diversity, and Evolution of Protein Toxins from Spore-Forming Entomopathogenic Bacteria. *Annual Review of Genetics*, 37, 1, 409-433.
- Ekino, K; Okomura, S; Ishikawa, T; Kitada, S; Saitoh, H; Akao, T; Oka, T; Nomura, Y; Ohba, M; Shin, T; & Mizuki, E. (2014). Cloning and Characterization of a Unique Cytotoxic Protein Parasporin-5 Produced by *Bacillus thuringiensis* A1100 Strain. *Toxins*, 6(6), 1882-1895.
- Espino-Vázquez, A; Gómez-Treviño, A; Galán-Wong, L; & Pereyra-Alfárez, B. (2012). Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains with cytotoxic activity against MOLT-4, a leukemia cell line. In *Microbes in Applied Research: Current Advantages and Challenges*, p147-151.
- García, R. (2016). Estado del arte de la actividad anticancerígena de proteínas parasporinas de *Bacillus thuringiensis*. Trabajo de grado – Maestría en Ciencias – Química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.
- González, E; Granados, JC; Short, JD; Ammons, DR; & Rampersad, J. (2011). Parasporins from a Caribbean Island: Evidence for a Globally Dispersed *Bacillus thuringiensis* Strain. *Current Microbiology*, 62 (5), 1643-1648.
- Hayakawa, T; Kabagawa, R; Kotani, Y; Kimura, M; Yamagiwa, M; Yamane, Y; Takebe, S; & Sakai, H. (2007). Parasporin-2Ab, a newly isolated cytotoxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Current Microbiology*, 55 (4), 278-283.
- Ito, A; Sasaguri, Y; Kitada, S; Kusaka, Y; Kuwano, K; Masutomi, K; & Ohba, M. (2004). A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic action to human cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (20), 21282-21286.
- Jung, YC; Mizuki, E; Akao, T; & Côté, JC. (2007). Isolation and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* strain expressing a novel crystal protein with cytotoxic activity against human cancer cells. *Journal of Applied Microbiology*, 103(1), 65-79.
- 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.
- Katayama, H; Kusaka, Y; Yokota, H; Akao, T; Kojima, M; Nakamura, O; & Mizuki, E. (2007). Parasporin-1, a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*, induces Ca²⁺ influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration in toxin-sensitive cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(10), 7742-7752.
- Katayama, H; Kusaka, Y; & Mizuki, E. (2011). *U.S. Patent Application No. 12/935,513*. US20090935513. 2009-03-30. Fukuoka Prefectural Government.
- Kitada, S; Abe, Y; Shimada, H; Kusaka, Y; Matsuo, Y; Katayama, H; & Sasaguri, Y. (2006). Cytotoxic actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26350-26360.
- Krishnan, K; Ker, J; Mohammed, SM; & Nadarajah, VD. (2010). Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a binding protein for a 68-kDa *Bacillus thuringiensis* parasporal protein cytotoxic against leukaemic cells. *Journal of Biomedical Science*, 17(1), 86.
- Krishnan, V. (2013). Investigation of parasporins, the cytotoxic proteins from the bacterium *Bacillus thuringiensis*. Doctoral dissertation, Department of Biochemistry, School of Life Sciences, University of Sussex.
- Kuroda, S; Begun, A; Saga, M; Hirao, A; Mizuki, E; Sakai, H; & Hayakawa, T. (2012). Parasporin 1Ac2, a novel cytotoxic crystal protein isolated from *Bacillus thuringiensis* B0462 strain. *Current Microbiology*, 66 (5), 475-480.
- Lenina, N.K; Naveenkumar, A; Sozhavendan, AE; Balakrishnan, N; Balasubramani, V; & Udayasuriyan, V. (2014). Characterization of parasporin gene harboring Indian isolates of *Bacillus thuringiensis*. *3 Biotech*, 4(5), 545-551.

- Mizuki, E; Park, Y. S; 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.
- Moazamian, E; Bahador, N; Azarpira, N; & Rasouli, M. (2018). Anti-cancer parasporin toxins of new *Bacillus thuringiensis* against Human Colon (HCT-116) and Blood (CCRF-CEM) Cancer cell lines. *Current Microbiology*, 75 (8),1090-1098.
- Nagamatsu, Y; Okamura, S; Saitou, H; Akao, T; & Nagand Mizuki, E. (2010). Three Cry toxins in two types from *Bacillus thuringiensis* strain M019 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 74(3), 494-498.
- Ohba, M; Mizuki, E; & Uemori, A. (2009). Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Research*, 29(1), 427-433.
- Okasov, A; Nersesyan, A; Kitada, S; & Ilin, A. (2015). Parasporins as new natural anticancer agents. Review Article. *J BUON*, 20(1), 5-16.
- Okumura, S; Akao, T; Higuchi, K; Saitoh, H; Mizuki, E; Ohba, M; & Inouye, K. (2004). *Bacillus thuringiensis* serovar shandongensis strain 89-T-34-22 produces multiple cytotoxic proteins with similar molecular masses against human cancer cells. *Letters in Applied Microbiology*, 39(1), 89-92.
- Okumura, S; Saitoh, H; Wasano, N; Katayama, H; Higuchi, K; Mizuki, E; & Inouye, K. (2006). Efficient solubilization, activation, and purification of recombinant Cry45Aa of *Bacillus thuringiensis* expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 47(1), 144-151.
- 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*, 14, 225-252.
- Okumura, S; Ohba, M; Mizuki, E; Crickmore, N; Côté, JC; Nagamatsu, Y; Kitada, S; Sakai, H; Harata, K; & Shin, T. (2010). "Parasporin nomenclature" (<http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>).
- Okumura, S; Saitoh, H; Ishikawa, T; Inouye, K; & Mizuki, E. (2011). Mode of action of parasporin-4, a cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808(6), 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(11), 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(7), 2115-2126.
- Periyasamy, A; Kkani, P; Chandrasekaran, B; Ponnusamy, S; Viswanathan, S; Selvanayagam, P; & Rajiah, S. (2016). Screening and characterization of a non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* strain producing parasporal protein with selective toxicity against human colon cancer cell lines. *Annals of Microbiology*, 66(3), 1167-1178.
- Poormina, K; Selvanayagam, P; & Shenbagarathai, R. (2010). Identification of native *Bacillus thuringiensis* strain forma south India ha Ing specific cytotoxic activity against cancer cells. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 348-354.
- Saitoh, H; Okumura, S; Ishikawa, T; Akao, T; Mizuki, E; & Ohba, M. (2006). Investigation of a novel *Bacillus thuringiensis* Gene Encoding a Parasporal Protein, Parasporin-4, That preferentially Kills Human Leukemia T Cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70(12), 2935-2941.
- Soberón, M; López-Díaz, JA; & Bravo, A. (2013). Cytotoxic proteins produced by *Bacillus thuringiensis*: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides*, 41, 87-93.
- Tsuzuki, K; Kimura, K; Fujii, N; Yokosawa, N; Indoh, T; Murakami, T; & Oguma K. (1990). Cloning and complete nucleotide sequence of the gene for the main component of hemagglutinin produced by *Clostridium botulinum* type C. *Infection and Immunity*, 58, 3173-3177.
- Uemori, A; Maeda, M; Yasutake, K; Ohgushi, A; Kagoshima, K; Mizuki, E; & Ohba, M. (2007). Ubiquity of Parasporin-1 producers in *Bacillus thuringiensis* natural population of japan. *Naturwissenschaften*, 94, 34-38.

- 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 (1A), 91-95.
- Uribe, D; Martinez, W; & Cerón, J. (2003). Distribution and diversity of genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 82, 119-127.
- Vilas-Bôas, GT; Peruca, AP; & Arantes, OM. (2007). Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.* 53, 673-687.
- Xu, C; Wang, BC; Yu, Z; & Sun, M. (2014). Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins*, 6(9), 2732-2770.
- Yamashita, S; Katayama, H; Saitoh, H; Akao, T; Shin, Y; Park, YS; 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. *J. Biochem.*, 138, 663-672.
- Yasutake, K; Binh, ND; Kagoshima, K; Uemori, A; Ohgushi, A; Maeda, M; Mizuki, E; Yu, YM; & Ohba, M. (2006). Occurrence of parasporin-producing *Bacillus thuringiensis* in Vietnam. *Can. J. Microbiol*, 52, 365-372.
- Yasutake, K; Uemori, A; Binh, N. D; Mizuki, E; & Ohba, M. (2008). Identification of parasporin genes in Vietnamese isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 63(1-2), 139-143.
- Zhong, Y; Wang, Q.J; Li, X; Yan, Y; Backer, JM; Chait, BT; Heintz, N; & Yue, Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol 3-Kinase complex. *Nature Cell Biology*, 11, 468-476.