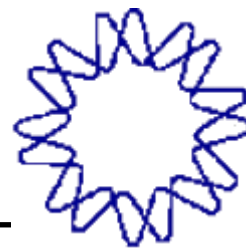




Universidad Nacional Autónoma de México



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

“Bases moleculares del sinergismo entre las  $\delta$ -endotoxinas  
Cry11Aa y Cyt1Aa de *Bacillus thuringiensis* subespecie  
*israelensis*”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS  
P R E S E N T A  
M. en C. CLAUDIA DOLORES PÉREZ ORTEGA

DIRECTORA DE TESIS  
DRA. ALEJANDRA BRAVO DE LA PARRA

CUERNAVACA, MOR.

OCTUBRE 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

La vida es un cúmulo de sucesos, buenos y malos, que te hacen crecer como ser humano y te fortalecen para que seas capaz de cumplir todos y cada uno de tus sueños. La mayoría de las veces, caminar por este sendero no es cosa fácil, pero todo se vuelve mucho más amable cuando a tu lado transitan personas que con una simple sonrisa, son capaces de hacer que en plena tormenta salga el sol y un arco iris de posibilidades se abra delante de tus ojos.

Dedico este trabajo a esas personas...

... las más importantes de mi vida... aquellas que en todo momento me han demostrado que ser valiente implica lágrimas, pero al final, te deja grandes satisfacciones.

A mis padres, *Juan y Lolita*, no sólo por el hecho de darme la vida, sino porque gracias a sus consejos, cuidados y apoyo, he logrado cumplir este gran sueño. Si cerrando mis ojos pudiera regresar el tiempo atrás, vería, indiscutiblemente, que en todos y cada uno de los momentos críticos de mi vida, han estado allí para tenderme una mano y decirme que no debo tener miedo... que lo importante no es caer, sino levantarse... y que las metas, por muy lejanas que parezcan, con tesón y coraje, siempre se pueden alcanzar. Gracias por brindarme su cariño incondicional de la manera en la que lo han hecho. Gracias por no dejarme sola nunca y por enseñarme a ser feliz. Gracias por las idas y venidas a Cuernavaca, por estar siempre dispuestos a escucharme, por soportarme en esos momentos en que ni yo misma me tolero y por todos esos pequeños detalles que han hecho mi vida tan especial. Dicen por ahí que ser padre no es cosa fácil, pero sin duda alguna, ser hija de unos padres como ustedes es lo más hermoso y grande del mundo. ¡Los amo profundamente!

A mis hermanos, *Vero y Juan*, quienes me han acompañado desde pequeña en este tránsito de experiencias llamado vida. Todos los recuerdos que guardo de ustedes son maravillosos. Cada juego... cada anécdota... cada tarde compartida, todo se reduce a un amor intenso que los convierte en los mejores amigos que puedo tener. Gracias por ser un ejemplo de vida: Verito con su responsabilidad, diligencia y enorme corazón; Johnny con su audacia, optimismo e infinita seguridad. Cada uno a su modo, me ha enseñado a ser un mejor ser humano, a no dejarme vencer por más duro que sea el reto y aprender a afrontar

los problemas de la vida con la mejor de las sonrisas. Si bien es cierto que soy la hermana pequeña de la familia, ustedes siempre me han hecho sentir grande, y eso es lo que los hace increíblemente especiales. Gracias por ser mis hermanos queridos. ¡Los quiero muchísimo!

A mis tías *Esperanza* y *Angelina*, por ser como mis segundas mamás... aquellas que hicieron de mi infancia y adolescencia, un cuento con muchas hadas buenas a mi alrededor. Las quiero más que nunca.

A mis abuelitos *Rafael* y *Liborio*, por mostrarme el valor importantísimo de la familia y la inagotable sabiduría que sólo conceden los años.

A mi primo *Hugo* por ser como otro hermano más para mi; a mis primos *Sele* y *Paco* por los hermosos sobrinos que me han dado; a mi tía *Jose* por estar siempre pendiente de mi, tanto en sus llamadas como en sus oraciones; a mis sobris *Paco* y *María*, por todos los momentos divertidos que hemos compartido juntos; y en general, a todos mis tíos, primos, sobrinos y amigos, porque cada uno a su modo, me ayudó a no sentirme sola durante mi estancia en Cuernavaca. Les agradezco de corazón su cariño y palabras de aliento. Ustedes son parte de esta gran fortaleza que protege mi corazón y que no tiene otro nombre que el de familia.

*Dios*, gracias por todas tus bendiciones. Cada día que pasa, creo y confío más en ti.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue posible gracias a la colaboración y la asesoría de muchas personas, sin las cuales, no se hubiera podido realizar.

Primero que nada, mil gracias a la ***Dra. Alejandra Bravo***, por brindarme un lugar en su laboratorio y apoyarme tanto en el aspecto académico, como en el personal. Gracias por ser parte de mi formación profesional y enseñarme a ser crítica y emprendedora. Me siento muy orgullosa de haberla conocido y siempre será un ejemplo de vida para mí, no sólo porque es una gran profesional, sino también, una mujer excepcional.

Al ***Dr. Mario Soberón***, por el apoyo constante, las ideas atinadas y los comentarios pertinentes para el enriquecimiento del trabajo. Valoro mucho todos y cada una de las palabras y consejos que junto con la Dra. Ale me brindó, sobre todo en esos momentos en que parecía romperme. Estoy muy orgullosa de haber tenido la oportunidad de conocerle y trabajar cerca de usted.

A los doctores ***Humberto Lanz*** y ***Gloria Saab***, miembros de mi comité tutorial, porque gracias a sus comentarios y observaciones, logramos redondear muchas ideas del proyecto. En especial, mil gracias a usted, Dr. Lanz, porque me acompañó en esta aventura del posgrado desde el primer semestre. Sin lugar a dudas, usted es parte importante de mi formación académica y le agradezco enormemente su amabilidad y total disposición. Gracias.

Al ***Dr. Jorge Luis Folch*** y al ***Dr. Jian Guang-Shun***, quienes de manera entusiasta y activa participaron en parte importante de la realización experimental de este trabajo. Jordi, mil gracias por tus consejos, comprensión y paciencia.

A los doctores ***Alejandra Covarrubias***, ***Edmundo Calva***, ***Lorenzo Segovia e Ismael Bustos***, miembros del jurado de examen, por sus aportaciones para enriquecer el

documento de tesis. Aprecio todas y cada una de sus observaciones y les reiteró mi agradecimiento por tomarse el tiempo de leer mi escrito y discutirlo.

A los doctores **Juan Miranda, Isabel Gómez, Carlos Muñoz, Liliana Pardo** y **Luisa Fernández**, porque cada uno me brindó un poco de su experiencia y me ayudó a superar obstáculos a lo largo del trabajo experimental. **Carlos**, fue un placer trabajar contigo. Te agradezco tu disposición, amabilidad y tiempo. **Liliana**, la incomparable Dra. Pardo. ¡Eres todo un ejemplo a seguir! Tanto como profesional, como madre y amiga. Gracias por compartir conmigo tantas charlas amenas y brindarme todos tus consejos. Cada momento que compartimos lo valoro y atesoro en mi corazón, pues sé que me lo brindaste con el mismo cariño con el que yo lo hice. Te quiero mucho Lily y te deseo la espera más bonita del mundo. **Luisa**... ¿qué puedo decirte? Tú sabes lo mucho que te quiero y admiro. No sólo eres una excelente profesional, sino una incomparable persona y una super mamá. Estoy feliz de haber tenido la oportunidad de trabajar contigo hombro con hombro, porque mucho de lo que sé, te lo debo a ti, así que mil gracias por compartir tu tiempo y conocimientos conmigo. ¡Suerte en todo, Güera linda y que seas feliz siempre!

Al **Biol. Jorge Sánchez**, por su paciencia y amabilidad, por enseñarme a trabajar en el laboratorio y estar siempre dispuesto a ayudarme a resolver cualquier problema. ¡Chorch eres un gran vecino!

A la **Biol. Lizbeth Cabrera**, por su impresionante apoyo técnico, sin el cual, este trabajo no habría sido posible. Mamá Liz, ya una vez te lo dije, pero no viene mal repetirlo: te agradezco mucho por haber sido, desde el inicio, un pilar fuerte y constante que me ayudó a superar con éxito todos y cada uno de mis retos. Tú y tu hermosa familia siempre formarán parte importante de mi vida, pues no sólo me abrieron las puertas de su casa, sino también de su corazón. Eres una mujer incomparable y nunca me voy a cansar de presumir que eres mi amiga. Te quiero muchísimo y te deseo todas las bendiciones del mundo.

A mis compañeros de laboratorio **Nuria, Ángeles, Roberto, Ramiro, Leivi, Tere Martínez, Tere Fernández, Erandi, Ivan, Sabino, Fernando, Emiliano y Enrique**. Todos

son personas extraordinarias y me siento muy afortunada de haber contado con la fortuna de conocerles. *Nuri*, de las cosas buenas que me llevo de mi estancia en el IBT es tu incomparable amistad. No sólo admiro tu entereza y pensamiento libre, sino también tus increíbles valores y ganas de salir adelante. Hagas lo que hagas y estés donde estés, siempre serás una triunfadora, porque mujeres como tú, con esa garra y fuerza, llegan muy alto. Gracias por ser mi amiga y acompañarme en todas esas veces en que me sentí tan sola y triste. Te quiero y admiro muchísimo. *Brujita*... ¡mi mejor amiga en el mundo mundial! Las palabras me quedan cortas para describir lo feliz que estoy por haberte conocido. Siempre me pareciste una chica en extremo inteligente y simpática, pero ahora que hemos tenido la oportunidad de compartir más tiempo juntas, me doy cuenta que también eres una persona con un corazón enorme y una sensibilidad impresionante. Te quiero, te admiro y estoy segura que cualquier meta que te propongas, la alcanzarás sin complicaciones, porque agallas tienes... ¡y de sobra! ¡Eres grande Angelitos! Gracias por ser parte de mi vida y hacerme reír en esas veces donde creía que sólo podía llorar. TQM.

A *María Luisa Tabche, Carolina Raussell, Juan Conde, Itzel Benítez, Guadalupe Peña, Idalia López, Nancy Ontiveros, Christopher Padilla, Claudia Morera, Mayra Cabrera* y *Georgina Hernández* que aunque ya no están en el laboratorio, fueron soporte importante para mí tanto en el aspecto técnico como en el personal. Chicos, sé bien que estén donde estén, siempre serán unos triunfadores, porque todos son personas excelentes. Los quiero y los recuerdo con el mismo cariño de la primera vez.

A *Sergio Blancas* y *Alejandro Uribe*, por su impresionante apoyo a nivel técnico. ¡No sé que haríamos sin ustedes en el laboratorio! Gracias por ser siempre tan amables conmigo, sobre todo a *Checo*, ya que gracias a su ayuda, fue muchísimo más fácil la realización de este trabajo.

A *Graciela Domínguez*, por su alegría, amabilidad y eficiencia. Chelita, eres una persona increíble. Gracias por ser siempre paciente y dulce conmigo. Valoro muchísimo el apoyo que me diste a nivel administrativo y también personal, y aunque ya lo dije una vez,

lo reitero ahora... ¡eres nuestra hada resuelve problemas del lab! Gracias por estar siempre ahí para apoyarme y brindarme tu amistad. ¡Eres divina!

A la *Unidad de síntesis del IBT* por la realización de los oligos para este trabajo.

Al departamento de docencia, comandando por el *Ing. Jalil, Gloria Villa y Maribel Velasco*, por todo su apoyo y guía en las cuestiones administrativas y de trámites. Son unas excelentes personas.

A *CONACyT y DGEP-UNAM*, por la ayuda económica otorgada durante la realización de este trabajo.

Y a todas las personas que colaboraron, de una u otra manera en la realización de este trabajo... MUCHAS GRACIAS.

Todo el trabajo académico y los conocimientos que acumulé durante cuatro años se resumen en esta tesis. No obstante, los momentos que experimenté en el laboratorio, buenos y malos... esos van directo a mi corazón como el recuerdo imborrable de una de las etapas más enriquecedoras de mi vida... porque hasta de la experiencia más triste se aprenden cosas alegres... y no siempre la adversidad es tan mala como parece.

*Claudia.*



El presente trabajo de investigación se realizó  
en el Departamento de Microbiología  
Molecular del Instituto de Biotecnología de la  
UNAM, bajo la dirección de la Dra.  
Alejandra Bravo de la Parra.

# ÍNDICE

	No. de página
Índice general .....	1
1a. RESUMEN .....	5
1b. ABSTRACT .....	7
2. INTRODUCCIÓN.....	9
2.1 El dengue, un problema real de nuestro tiempo .....	9
2.2 Generalidades de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) .....	13
2.3 Clasificación y nomenclatura de las $\delta$ -endotoxinas de Bt.....	15
2.4 Proteínas Cry .....	19
2.4.1 Estructura de las toxinas Cry .....	19
2.4.2 Mecanismo general de acción de las toxinas Cry en insectos lepidópteros.....	21
2.4.2.1 Solubilización y procesamiento de las protoxinas Cry.....	22
2.4.2.2 Unión de las toxinas Cry a su receptor .....	22
2.4.2.3 Formación de una estructura de pre-poro u oligómero .....	28
2.4.2.4 Inserción en membrana y formación de poro .....	29
2.4.2.5 Citólisis.....	34
2.4.3 Mecanismo general de acción de las toxinas Cry en insectos dípteros .....	34
2.5 Proteínas Cyt .....	37
2.5.1 Estructura de las toxinas Cyt .....	37
2.5.2 Inhibición de toxicidad inducida por lípidos .....	39
2.5.3 Canales selectivos a cationes, segmentos de toxina y modelo de formación de poro para las toxinas Cyt .....	39
2.5.4 Cyt1Aa como detergente .....	40
2.6 Subespecies de Bt con actividad mosquitocida .....	42
2.7 <i>Bacillus thuringiensis</i> subespecie <i>israelensis</i> .....	42

2.8 Sinergismo entre toxinas Cry y Cyt de Bti.....	44
3. HIPÓTESIS .....	47
4. OBJETIVOS.....	51
4.1 Objetivos generales.....	51
4.2 Objetivos específicos.....	51
5. MATERIAL Y MÉTODOS .....	53
5.1 Cepas .....	53
5.2 Selección de antibiótico.....	53
5.3 Purificación y procesamiento de proteínas Cry11Aa y Cyt1Aa.....	54
5.4 Purificación de vesículas de membrana de microvellosidad apical (VMMAs).....	55
5.5 Determinación de concentración de proteína total .....	55
5.6 Bioensayos con larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	56
5.7 Determinación del factor de sinergismo .....	57
5.8 Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	58
5.9 Biotinilación de proteínas.....	58
5.10 Análisis de unión secuencial sobre VMMA de <i>Ae. aegypti</i> .....	58
5.11 Ensayo de unión a ligando (ligand blot).....	59
5.12 Western Blot.....	59
5.13 ELISA.....	60
5.14 Ensayo de inmunoprecipitación.....	60
5.15 Construcciones para el sistema de dos híbridos .....	61
5.16 Sistema de dos híbridos en levadura .....	62
5.17 Transformación de levadura por método de acetato de litio.....	65
5.18 Extracción de DNA plasmídico a partir de levadura.....	65
5.19 Prueba cualitativa de expresión de $\beta$ -galactosidasa en levadura (ensayo de filtro).....	66

5.20 Unión de Cry11A a péptidos inmovilizados en membrana de Nitrocelulosa por síntesis SPOT.....	66
5.21 Mutagénesis sitio-dirigida.....	67
5.22 Determinación de las constantes de afinidad entre las proteínas Cry y Cyt por ensayo de ELISA competitiva.....	68
5.23 Preparación de vesículas unilamelares pequeñas (SUV).....	68
5.24 Ensayo de oligomerización de Cry11Aa.....	68
5.25 Ensayos de permeabilización a membrana (medidas de fluorescencia).....	69
6. RESULTADOS.....	74
6.1 Bioensayos y pruebas de sinergismo entre Cry11Aa y Cyt1Aa.....	75
6.2 Unión secuencial de Cry11Aa y Cyt1Aa en VMMA de <i>Ae aegypti</i> .....	82
6.3 Interacción de las proteínas Cry11Aa y Cyt1Aa en solución y en presencia de VMMA de <i>Ae aegypti</i> .....	86
6.4 Identificación de epítopes de unión entre Cry11Aa y Cyt1Aa.....	88
6.5 Análisis de la importancia en la interacción de Cry11Aa y Cyt1Aa sobre el proceso de sinergismo <i>in vivo</i> .....	93
6.6 Análisis de la participación de Cyt1Aa en el proceso de oligomerización de Cry11Aa en solución y en presencia de membranas (VMMA de <i>Ae. aegypti</i> y SUV).....	99
6.7 Evaluación de la actividad formadora de poro del oligómero de Cry11Aa.....	101
6.8. Las mutantes afectadas en sinergismo están afectadas en su proceso de formación de oligómero.....	103
7. DISCUSIÓN.....	106
8. CONCLUSIÓN.....	112

9. PERSPECTIVAS.....	114
APÉNDICE I. Contribución original. <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. PNAS. 2005. 102(51), 18303-18308.....	116
Supporting Information. Pérez <i>et al.</i> , 2005. 102(51), 18303-18308 .....	123
APÉNDICE II. Contribución original. <i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>israelensis</i> Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. Artículo aceptado en la revista Cellular Microbiology, 2007. En prensa.....	129
APÉNDICE III. Artículo en colaboración. Cry11Aa toxin from <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> binds its receptor in <i>Aedes aegypti</i> mosquito larvae through loop $\alpha$ 8 of domain II. FEBS Letters. 2005. 579, 3508-3514.....	137
APÉNDICE IV. Otras contribuciones. Mode of action of mosquitocidal <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> toxins. Toxicon. 2007. 49, 597-600.....	145
APÉNDICE V. Otras contribuciones. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> . Peptides. 2007. 28, 169-173.....	150
APÉNDICE VI Medios de cultivo.....	156
APÉNDICE VII Bases del análisis Probit.....	159
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	166

## RESUMEN

*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) es una bacteria con capacidad insecticida contra insectos del orden Díptera (mosquitos) que ejerce su acción a través de la producción de toxinas formadoras de poro. Particularmente, esta bacteria produce dos tipos diferentes de toxinas (Cry y Cyt), y una de ellas, la toxina Cyt1Aa, ha mostrado ser importante debido a que sinergiza la actividad tóxica del resto de las toxinas Cry al mismo tiempo que suprime la resistencia que los mosquitos generan a dichas toxinas. Por lo tanto, el estudio del mecanismo molecular del sinergismo entre las toxinas Cry y Cyt representa una alternativa interesante para contender con problemas de resistencia en insectos.

En este trabajo demostramos que la toxina Cyt1Aa funciona como un receptor para la toxina Cry11Aa, siendo este uno de los primeros ejemplos de una bacteria entomopatógena que lleva consigo tanto al agente tóxico (toxina) como al receptor del mismo. Para demostrarlo, primero analizamos la interacción *in vitro* entre Cry11Aa y Cyt1Aa mediante diferentes técnicas (ensayos de unión a ligando, ELISA, co-inmunoprecipitación y sistema de dos híbridos en levadura), lo que proveyó evidencia de que Cyt1Aa era capaz de incrementar la unión de la toxina Cry11Aa, e incluso, favorecer su proceso de oligomerización. Se mapearon los epítopes de unión entre Cyt1Aa y Cry11Aa y a partir de mutagénesis sitio-dirigida en dichas regiones se identificaron residuos claves en la interacción de Cry11Aa (S259 y E266) con Cyt1Aa (K198, E204 y K225). Con estas mutantes se llevaron a cabo bioensayos *in vivo* usando larvas de *Aedes aegypti* demostrándose una correlación directa entre la interacción de las toxinas y su habilidad para sinergizar. Estos datos indican que la interacción entre Cyt1Aa y Cry11Aa es relevante en el proceso de sinergismo *in vivo*.

Por otro lado, también se evaluó la participación de Cyt1Aa en el proceso de oligomerización de Cry11Aa, el cual, es un paso clave en el modo de acción general de las toxinas Cry. Previamente se reportó que en las toxinas tipo Cry1A la interacción con su receptor es necesario para que se induzca un corte proteolítico que dará como resultado la oligomerización de la toxina. Dado que sugerimos que la toxina Cyt1Aa

funciona como un receptor para Cry11Aa, evaluamos la oligomerización de Cry11Aa en su forma de protoxina soluble en presencia y ausencia de la toxina Cyt1Aa. El resultado de estos experimentos mostró que cuando la toxina Cyt1Aa está presente en la reacción de activación de Cry11Aa, es posible observar la formación de una estructura oligomérica de aproximadamente 250 kDa, que es similar a las otras estructuras reportadas para toxinas tipo Cry1A. Para evaluar la funcionalidad del oligómero de Cry11Aa, realizamos dos ensayos de permeabilidad de membrana: 1) liberación de calceína y 2) análisis de cambios en potencial de membrana de iones  $K^+$ . Se observó una alta actividad formadora de poro con ambos ensayos usando el oligómero de Cry11Aa, en contraste a la actividad nula que mostraron las muestras control que involucraba a las proteínas Cry11Aa y Cyt1Aa activadas individualmente. Por lo tanto, se concluyó que la actividad formadora de poro correlaciona con la formación de la estructura oligomérica de 250 kDa de Cry11Aa. Para reforzar la anterior afirmación, también se analizó la oligomerización de las mutantes en Cry11Aa y Cyt1Aa que estaban afectadas en su interacción y sinergismo *in vivo*. Se observó una correlación directa entre la formación de oligómero y la interacción entre Cry11Aa-Cyt1Aa. Estos datos sustentan de forma contundente que la interacción de Cry11Aa con Cyt1Aa es necesaria para la formación de una estructura de oligómero capaz de insertarse en membrana.

En conclusión, nuestros datos explican el mecanismo molecular de sinergismo de Cyt1Aa sobre la toxicidad de Cry11Aa. Es un mecanismo nuevo, no previamente documentado en la literatura, que muestra como una bacteria entomopatógena incrementa su toxicidad sobre su insecto blanco a través de la producción del agente invasor (toxina) y un receptor extra del mismo, proveyendo así de información vital para contender con la resistencia que puede darse debido a mutaciones en los receptores nativos localizados en el intestino medio del insecto.

## ABSTRACT

*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) is a pathogen of dipteran insects (mosquitoes) that rely on pore-forming toxins to exert its pathogenic effect. This bacterium produces two different types of toxins (Cry and Cyt). One of the most interesting features of Bti is that Cyt1Aa toxin synergizes the activity of Cry toxins and suppresses resistance in mosquitoes to Cry toxins. The synergism represents an interesting alternative for coping with insect resistance.

In this work we demonstrate that Cyt1Aa functions as a membrane bound receptor of Cry11Aa, this is one of the first examples of an insect pathogenic bacterium that carries a toxin and also its functional receptor. First we analyzed the *in vitro* interaction between Cry11A and Cyt1A by different methods (ligand blot assays, ELISA assays, coimmunoprecipitation assays and two hybrid system in yeast), and provide evidence that Cyt1Aa enhances the binding of Cry11Aa toxin and also induce its oligomerization. We mapped the Cyt1Aa and Cry11Aa binding epitopes involved in their interaction and performed site-directed mutagenesis on these regions, revealing key Cry11Aa (S259 and E266) and Cyt1Aa (K198, E204 and K225) residues important in their interaction. With these mutants we make *in vivo* bioassays using *Aedes aegypti* larvae and demonstrated a direct correlation between binding interaction and synergism factor. Thus, these data indicates that the interaction between Cyt1Aa and Cry11A is relevant in their *in vivo* synergism.

Secondly, we evaluated the participation of Cyt1A protein in the oligomerization process of Cry11A. We know from previous reports that oligomerization and pore formation constitute key steps in the mode of action of Cry toxins. It was reported that interaction of Cry1A toxins with its receptors is necessary to induce a proteolytical cleavage that resulted in Cry1A toxin oligomerization. Since Cyt1Aa functions as receptor of Cry11A, we evaluated the oligomerization of Cry11A protoxin in presence and absence of Cyt1A toxin. Only when Cyt1A is present in the mixture a 250-kDa Cry11Aa oligomeric structure was produce, similar to the oligomeric structure reported for Cry1A toxins. To evaluate the functionality of this Cry11A oligomer, we used two pore formation assays: calcein leakage and analysis of changes in membrane potential.



High pore-formation activities were observed with both assays for the samples containing the Cry11A oligomer in contrast to the control samples containing the individual Cyt1A or Cry11A proteins that showed no-activity. Therefore, the pore-formation activity correlated with the formation of Cry11Aa oligomeric structure of 250 kDa. In addition, we also assayed the oligomerization of the Cry11A and Cyt1A mutants affected in their binding interaction and in their synergism *in vivo*. A direct correlation between oligomer formation and Cry11A-Cyt1A binding interaction was demonstrated. These data strongly support that the binding interaction with Cyt1Aa is necessary to induce the formation of Cry11A oligomer, resulting in a pre-pore structure that is insertion-competent.

Overall, our results explain the mechanism of synergism of Cyt1Aa on Cry11Aa toxicity. This is a novel mechanism, not previously documented in the literature that allows this pathogen bacterium to enhance its toxicity and provide means to avoid resistance due to mutations in insect receptor molecules.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 El Dengue, un problema real de nuestro tiempo.

Los insectos del orden Díptera, como mosquitos, son vectores de muchas enfermedades infecciosas de amplia distribución mundial, entre ellas malaria, filaria y dengue. Esta última, en particular, constituye un problema de salud pública, debido a que es endémica en más de 100 países tropicales y el número de individuos infectados se ha incrementado durante los últimos años (Ghiteko *et al.*, 2000; Rutstein, 2000). México, de acuerdo con cifras oficiales, ocupa el quinto lugar de incidencia en América Latina, con un promedio de 8 mil casos de dengue clásico y más de mil 900 de la variedad hemorrágica cada año. Los estados con mayor riesgo para la enfermedad son: Sonora, Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa, Veracruz, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo, por tener condiciones climáticas que favorecen la reproducción del vector. No obstante, de diez años a la fecha, estados con temperaturas más templadas, como Morelos, Colima, Jalisco y Puebla, han reportado incidencia de la enfermedad, lo que convierte al dengue en un grave problema de salud pública a nivel nacional (Fuente: Secretaría de Salud Pública).

El dengue es transmitido mediante la picadura del mosquito *Aedes aegypti* (Figura 1A), un antropofílico estricto que se ha adaptado a vivir en áreas urbanas, por lo que se le cataloga como un mosquito doméstico. Se conocen tres variedades principales: *Ae. aegypti* var. *aegypti*, *Ae. aegypti* var. *formosus* y *Ae. aegypti* var. *queenslandensis*. La variante *aegypti* es la más distribuida en el mundo y tiene dos etapas bien diferenciadas en su ciclo de vida (Figura 2): **fase acuática** con tres formas evolutivas diferentes (huevo, larva y pupa) y **la fase aérea** o de adulto (Kumate *et al.*, 1998). En particular, *Ae. aegypti* necesita de temperaturas templadas y estancadas para la oviposición y eclosión de los huevecillos, así como para el desarrollo de las larvas (Figura 1B). De ahí que los nichos característicos de este insecto sean: recipientes varios, latas, cestos, macetas, llantas desechadas, etc.

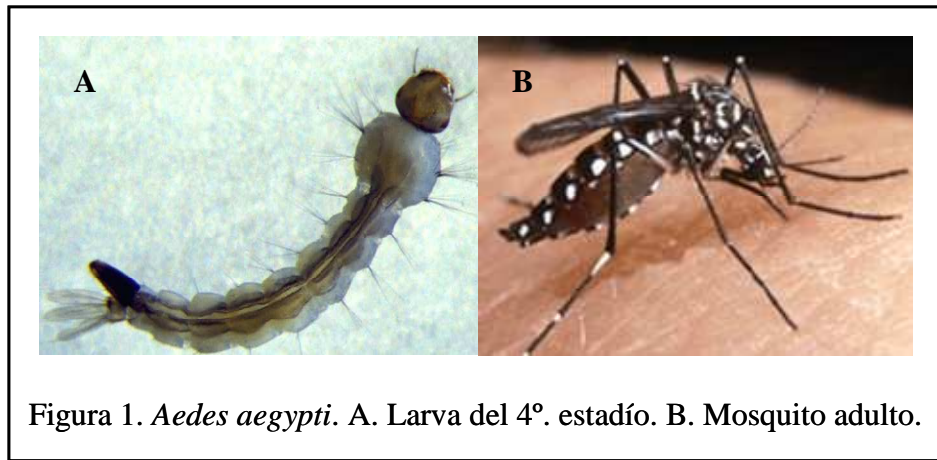


Figura 1. *Aedes aegypti*. A. Larva del 4º. estadio. B. Mosquito adulto.

El periodo en fase larvaria de *Ae. aegypti* comprende cuatro grados o estadios evolutivos denominados primero, segundo, tercero y cuarto. El tiempo aproximado para pasar de un estadio a otro es de aproximadamente 48 horas. El estado de pupa corresponde a la última etapa de maduración de la fase acuática. De ahí emerge el mosquito que corresponde a la fase adulta. Una vez que los mosquitos han emergido, se alimentan por primera vez entre las 20 y las 72 horas posteriores (Kumate *et al.*, 1998). Las hembras, al ser hematófagas, son las responsables de mantener el ciclo infeccioso del virus del Dengue (Kumate *et al.*, 1998).

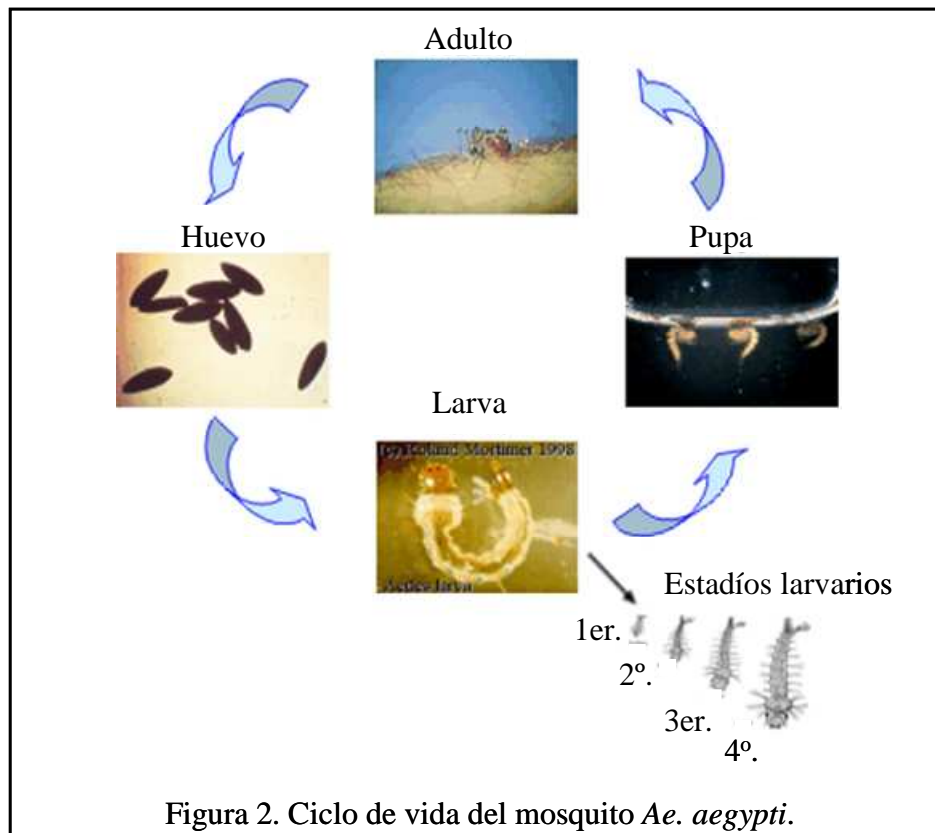


Figura 2. Ciclo de vida del mosquito *Ae. aegypti*.

*Ae. aegypti* adquiere el virus del dengue cuando se alimenta de una persona infectada y transmite la enfermedad a otros individuos durante la succión de sangre por el resto de su vida (Briceño *et al.*, 1996). El ciclo de infección que sigue el virus del Dengue una vez que ha sido adquirido por el mosquito hembra es el siguiente: el virus infecta las células epiteliales del intestino medio del mosquito, se disemina a través de la lámina basal hacia la circulación y termina por infectar las glándulas salivales. El virus establece una infección persistente y se replica en grandes cantidades en estas células. Posteriormente las glándulas lo secretan a la saliva, y tras picar al hospedero, la hembra del mosquito regurgita su saliva llena de virus hacia la sangre de su víctima. El virus circula en forma libre por el plasma y entra en contacto con células susceptibles, como las células endoteliales de los capilares, macrófagos, monocitos y demás células del sistema retículo-endotelial. El virus del dengue se replica en células de la médula ósea, hígado, tejido linfóide, bazo y piel, por ello su ataque suele ser sistémico y altamente peligroso (Navarro y Gómez, 1995). Las manifestaciones clínicas más comunes asociadas con la infección por el virus del dengue son: cefalea, dolor retro-orbital, mialgias, artralgias y exantema. (Briceño *et al.*, 1996; Navarro y Gómez, 1995; World Health Organization Technical Report, 271, 1986).

El dengue es producido por cuatro serotipos de virus de la familia *Flaviviridae*: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Los cuatro serotipos son capaces de producir infección asintomática, enfermedad febril y cuadros severos que pueden conducir hasta la muerte. Algunas variantes genéticas parecen ser más virulentas o tener mayor potencial epidémico. Los serotipos DENV-1 y DENV-2 fueron aislados en humanos en 1944, mientras que el DENV-3 y el DENV-4 se aislaron en 1957 (Briceño *et al.*, 1996). Los cuatro serotipos del virus del Dengue se encuentran distribuidos en nuestro país, pero el serotipo que predomina es el DENV-2 (Fuente: Secretaría de Salud).

Desde el punto de vista epidemiológico, la enfermedad del dengue comprende cuatro variantes: enfermedad febril no específica, fiebre de dengue clásico (DF), fiebre de dengue hemorrágico (DHF), síndrome de choque por dengue (DSS) y otros síndromes severos de dengue (encefalopatía asociada a dengue, cardiomiopatía y hematuria macro y microscópica). No obstante, las formas clínicas más comúnmente observadas en América Latina y que están perfectamente bien definidas son la DF y la DHF, en presencia o

ausencia de DSS (Isturiz *et al.*, 2000). La fiebre de dengue hemorrágico (DHF), puede ser fatal y es una causa importante de mortalidad en niños. En 1998, hubo más de 600,000 casos de dengue en América Central y en Sudamérica, de los cuales 11,000 casos fueron DHF. Esto es el doble de casos registrados en la misma región en 1995 (Martínez, 1995; Rico-Hesse *et al.*, 1997). En 1962, como parte del programa de erradicación de la fiebre amarilla, la Secretaría de Salud Pública en México reportó la eliminación del mosquito *Ae. aegypti*. Sin embargo, a partir de 1978 el dengue clásico reapareció en el país cuando se introdujo el serotipo 1 a través de la frontera sur. Al año siguiente se diseminó rápidamente por los estados de Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo, Veracruz y Yucatán. En 1980 se presentó una de las mayores epidemias registradas hasta el momento con 51,406 casos. En 1982 se detectó la transmisión de los serotipos 1 y 4 en los estados de Oaxaca, Tamaulipas, Sinaloa, Guerrero y Puebla. Entre 1994 y 1998 se registraron 155,011 casos de DF con una media anual de 31,000 casos (Dirección General de Epidemiología, México, 1997; Norma Oficial Mexicana de Emergencia, 1999).

Desgraciadamente, a la fecha la enfermedad sigue diseminándose a través del país sin una baja considerable de casos y aun no existen vacunas ni medicamentos que puedan prevenir o curar ésta enfermedad, por lo que el mejor método para controlar el dengue es combatir al mosquito vector *Ae. aegypti* (Baird, 2000). El control de estos vectores se hace principalmente con insecticidas químicos, pero su uso ha comenzado a decaer debido a los altos costos que involucran, su escasa biodegradabilidad, el desarrollo de resistencia que varias poblaciones blanco han registrado contra ellos y los riesgos visibles hacia el medio ambiente y la salud humana que producen (Federici, 1995). Por ejemplo, la utilización mundial de DDT tuvo éxito en controlar mosquitos sólo durante 8 años, después de esto, los mosquitos desarrollaron resistencia a este insecticida (Baird, 2000). Debido a lo anterior se ha desarrollado un interés creciente en la investigación sobre nuevos agentes para el control de vectores, siendo el uso de bacterias entomopatógenas, la alternativa viable para llevar a cabo dicho control. Entre estas bacterias la más importante es *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* (Bti). (Lacey y Lacey, 1990).

## 2.2 Generalidades de *Bacillus thuringiensis* (Bt).

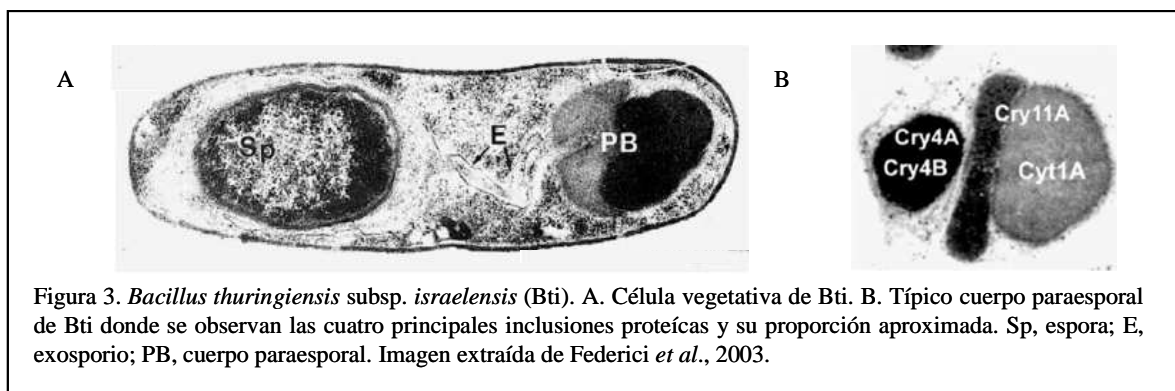
*Bacillus thuringiensis* (Bt) (Figura 3) es una bacteria Gram positiva, aerobia estricta y ubicua, pues ha sido aislada de diversos sistemas como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, entre muchos otros (Schnepf *et al.*, 1998). Su importancia biotecnológica radica en el hecho de que ha sido ocupada para la generación de bioinsecticidas activos contra diversas plagas de importancia agrícola y médica, así como para el desarrollo de plantas transgénicas resistentes al ataque de insectos plaga. Esta bacteria corresponde a la familia *Bacillaceae* perteneciente al grupo de *Bacillus cereus*, que involucra seis diferentes especies: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* y *B. weihenstephanensis* (Rasko *et al.*, 2005). En particular, Bt se distingue de otros miembros de *B. cereus* por su capacidad de producir inclusiones cristalinas con capacidad insecticida. A la fecha se han reportado más de 82 subespecies de Bt (Lecadet *et al.*, 1999).

El ciclo de vida de Bt cuenta con dos fases principales: la de *crecimiento vegetativo*, en donde las bacterias se duplican por bipartición cada 30-90 min, y la fase de *esporulación*, que es un programa de diferenciación de bacteria a espora que consta de siete fases y que se dispara cuando Bt se encuentra en limitación de nutrientes. La *fase I* (7 primeras horas) es aquella donde se induce la formación del filamento axial de Bt. En la *fase II* (a partir de la octava hora) se forma el septo espora de división asimétrica que involucra mesosomas. En la *fase III* (en la novena hora) inicia la síntesis del cristal insecticida, se dan cambios a nivel de membrana y citoplasma y se forma la espora. En las *fases IV a VI* (a las 12 horas) se forma el exosporio, la pared celular primordial, la corteza y las capas de protección de la espora. Por último, en la *fase VII* (evento posterior a las 12 horas) se da la maduración de la espora y la síntesis de enzimas líticas que liberan a los cristales insecticidas (Bechtel *et al.*, 1976).

Como mencionamos antes, durante las fases III a VI del ciclo de esporulación, Bt es capaz de producir uno o más cristales paraesporales de carácter proteínico ó  $\delta$ -endotoxinas, las cuales se pueden clasificar en dos grandes grupos: **Cry** y **Cyt** (Bechtel *et al.*, 1976).

Estas proteínas, a su vez, son consideradas dentro del gran grupo de toxinas formadoras de poro (PFT), las cuales, se caracterizan por ser secretadas por la bacteria en forma de proteínas solubles, para después, presentar cambios conformacionales que les permiten insertarse en membrana o translocarse a través de ella hacia su célula hospedera. Hay dos grandes grupos de PFT: 1) Las toxinas  $\alpha$ -hélicas, en las cuales, las regiones conformadas por  $\alpha$ -hélices forman el poro transmembranal, como por ejemplo, la toxina diftérica y 2) las toxinas  $\beta$ , donde las regiones conformadas por láminas  $\beta$ , se estructuran para formar una estructura de barril con la cual se insertan en membrana (como aerolisina) (Parker and Feil, 2005).

Las proteínas Cry (70 ó 130 kDa) pertenecen al grupo de toxinas  $\alpha$ -helicales y se definen como cualquier proteína paraesporal de Bt que muestre un efecto tóxico hacia algún insecto y que pueda ser comprobable por bioensayos (Crickmore *et al.*, 1998). Por su parte, las proteínas que se definen como Cyt (30 kDa) pertenecen a las toxinas tipo  $\beta$  y se definen como todas aquellas inclusiones paraesporales de Bt que muestran actividad hemolítica y tienen similitud con la secuencia de las toxinas Cyt (Crickmore *et al.*, 1998). A la fecha se han clonado y secuenciado más de 160 genes *cry* y 16 genes *cyt*. Las proteínas Cry son tóxicas contra insectos del orden Lepidoptera, Diptera, Coleoptera (Beegle, *et al.*, 1992), Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera y Mallophaga (Feitelson, 1993), así como nemátodos y protozoarios (Feitelson *et al.*, 1992). En contraste, las toxinas Cyt son encontradas en cepas de Bt activas contra insectos dípteros, con la excepción de una cepa activa contra coleópteros, la cual fue reportada como productora de una toxina tipo Cyt (Guerchicoff *et al.*, 2001).



### **2.3 Clasificación y nomenclatura de las $\delta$ -endotoxinas de Bt.**

En 1989, Höfte y Whiteley propusieron una nomenclatura para las  $\delta$ -endotoxinas Cry basada en la especificidad de la actividad insecticida. Sin embargo, esta primera clasificación pronto resultó inadecuada, pues se empezaron a encontrar proteínas Cry que eran muy semejantes pero con especificidad diferente ó toxinas Cry con actividad dual hacia dos distintos órdenes de insectos, lo que creó una gran confusión en la nomenclatura. Fue por ello que se estipuló una nueva forma de clasificación, que fuera más sistemática y basada exclusivamente en la similitud de la secuencia primaria (Crickmore *et al.*, 1998). Esta nomenclatura estipuló el cambio de números romanos por arábigos, la agrupación de las toxinas en grupos y subgrupos y el establecimiento de los límites de identidad que marcarían las diferencias entre categorías. De esta manera quedó establecido que el número arábigo que lleva el nombre de la toxina, se designa con la primera fila que corresponde hasta el 45% de identidad en secuencia primaria entre toxinas; la segunda hilera cataloga a las proteínas con una letra mayúscula y corresponde a identidades de 45 a 78%; la tercera fila asigna una letra minúscula y corresponde a identidades de 78 a 95%; y la última fila incluye un número arábigo al final de la nomenclatura indicando más de 95% de identidad (Figuras 4 y 5).

Aunque este sistema de clasificación no toma en cuenta la selectividad de las toxinas Cry hacia los diversos órdenes de insectos, algunos subgrupos de toxinas Cry muestran una coincidencia entre la similitud en secuencia y su toxicidad. Por ejemplo, las toxinas tipo Cry1 son activas principalmente contra insectos lepidópteros, mientras que las toxinas Cry3 son tóxicas contra coleópteros. En contraste, las toxinas Cry activas contra insectos dípteros (Cry1C, Cry2Aa, Cry4, Cry11), han demostrado pertenecer a diferentes subgrupos, por lo que tienen una baja similitud en secuencia.



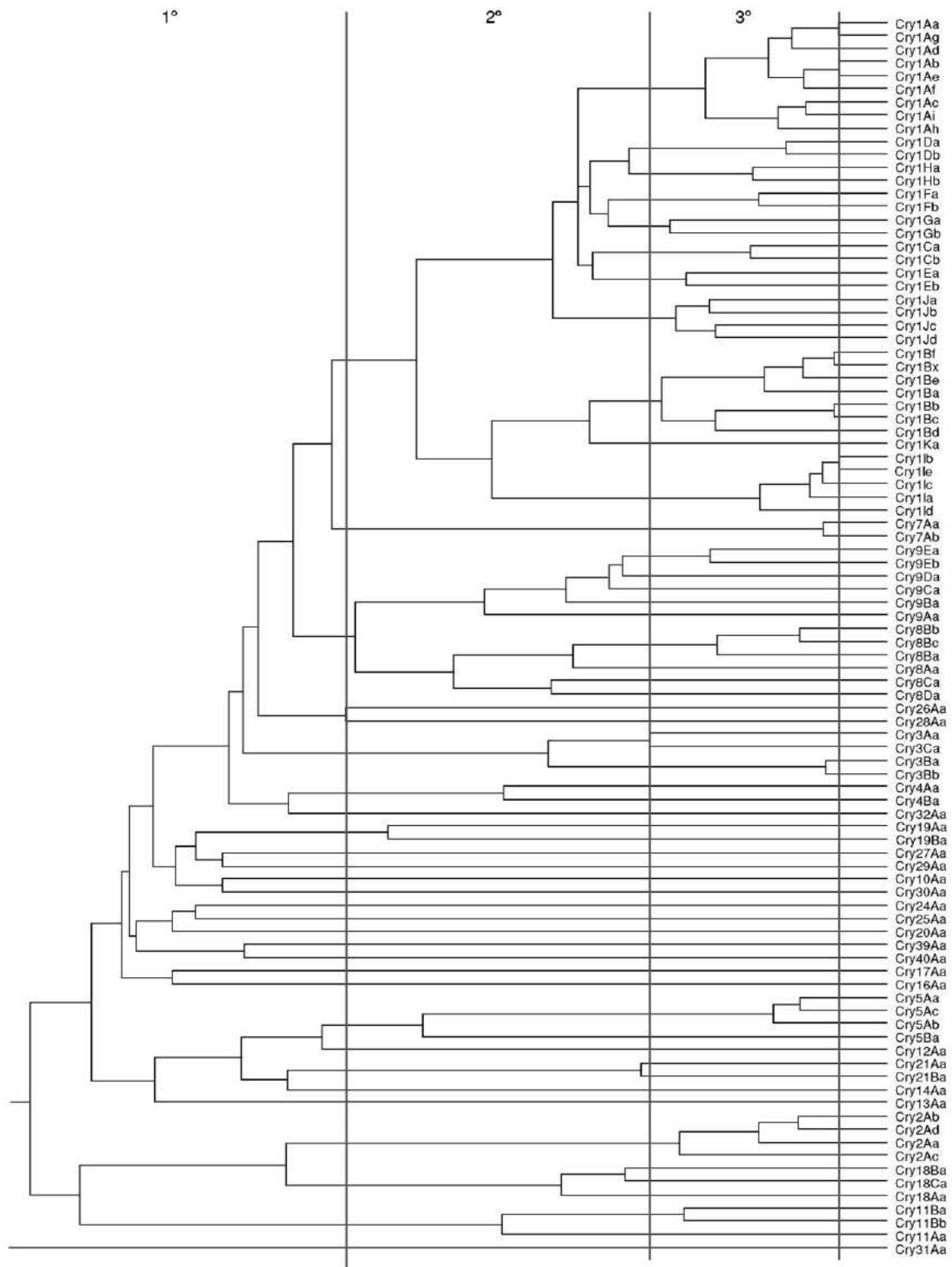


Figura 4. Dendrograma de las toxinas Cry de tres dominios. Imagen extraída del Sitio Web Oficial sobre Nomenclatura de Bt ([http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/)).

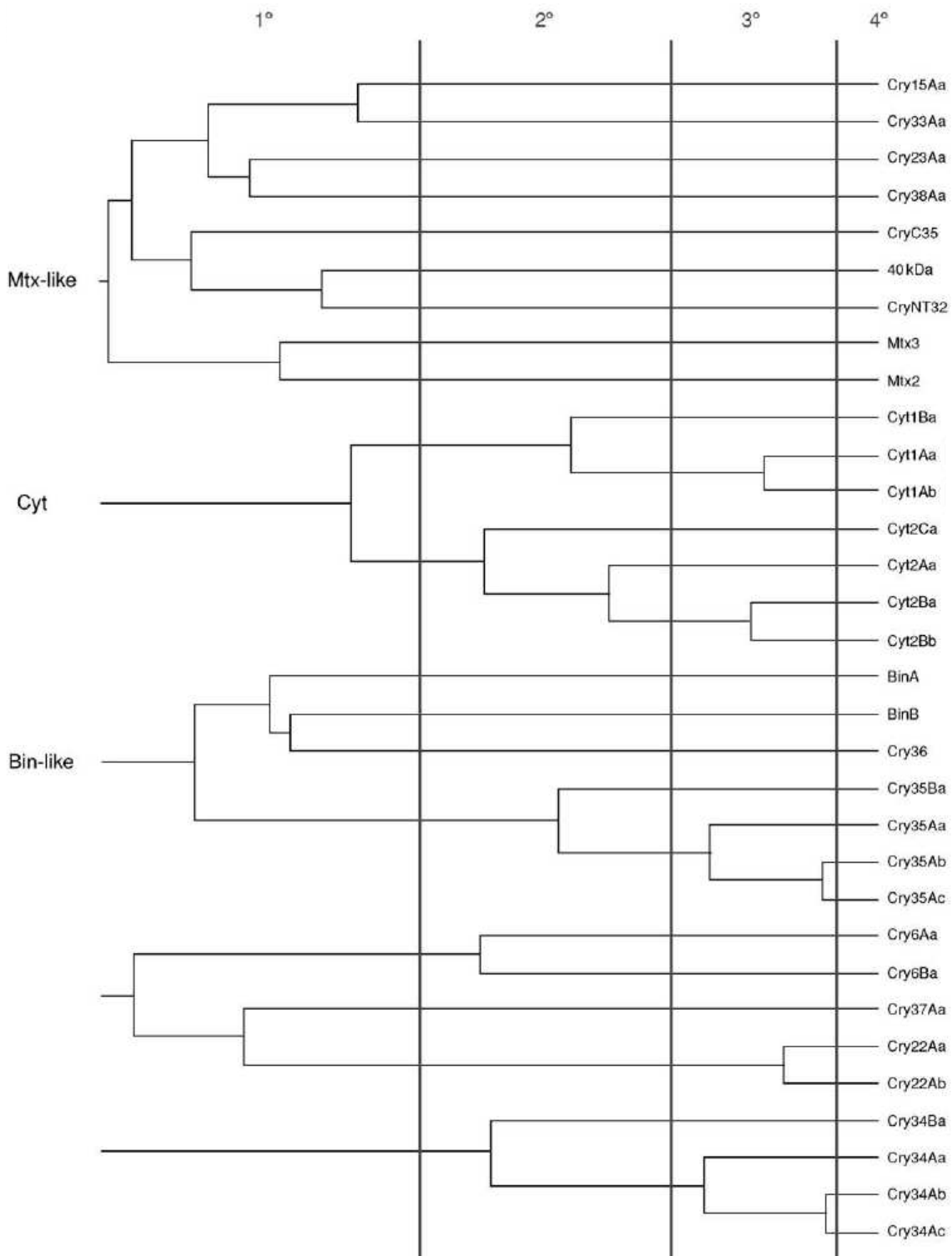


Figura 5. Dendrograma de las toxinas Cyt y otras toxinas insecticidas producidas por Bt. Imagen extraída del Sitio Web Oficial sobre Nomenclatura de Bt. ([http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/)).

De forma adicional, se ha reportado que el género *Bacillus* produce otras proteínas insecticidas que no están relacionadas filogenéticamente con la familia de las toxinas Cry de tres dominios o con las toxinas tipo Cyt, pero que por su alta capacidad insecticida, resultan de vital importancia. Entre ellas podemos destacar a las toxinas binarias de Bt Cry35 y Cry36 (comúnmente llamadas Bin-like); las toxinas Mtx-like (Cry15, Cry23, Cry33, Cry38 y Cry40) (Crickmore *et al.*, 1998, 2007); y las proteínas insecticidas vegetativas (proteínas Vip) (Estruch *et al.*, 1996).

Se sabe que las toxinas Bin-like y Mtx-like están vinculadas con las toxinas Bin y Mtx producidas por *B. sphaericus*, debido a su alta similitud en secuencia (Crickmore *et al.*, 1998). No obstante, la especificidad de ambas proteínas es diferente. Las toxinas Bin y Mtx de *B. sphaericus* son activas contra insectos dípteros, mientras que las de Bt lo son principalmente para coleópteros. Por su parte, las proteínas Vip son aquellas que se sintetizan durante la fase de crecimiento vegetativo de la bacteria. Estas proteínas comprenden tres familias con siete miembros que han mostrado ser activos contra insectos del orden Coleoptera (Vip1 y Vip2) y también del orden Lepidoptera (Vip3). Su mecanismo de acción aun no ha sido elucidado.

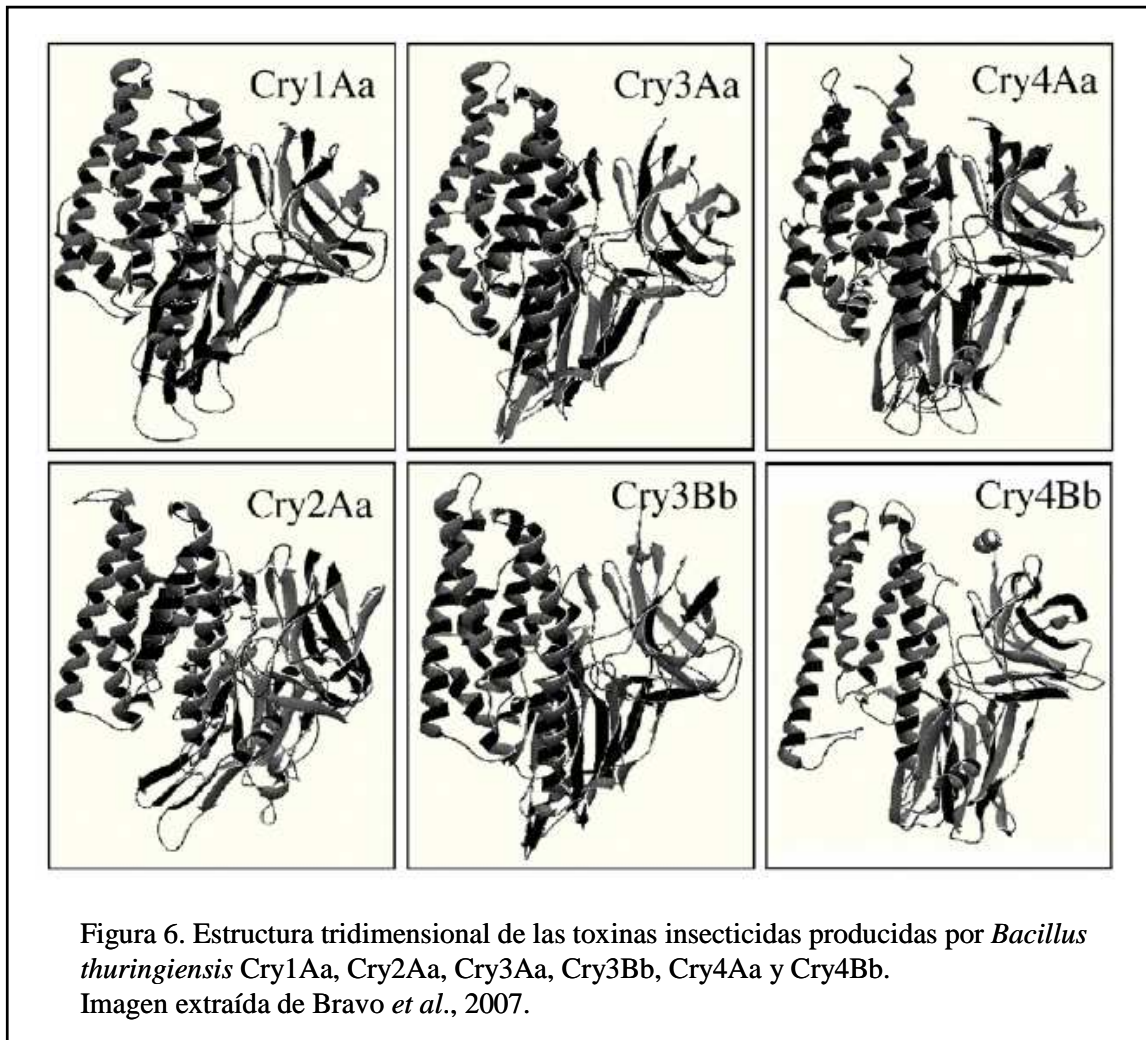
## 2.4 Proteínas Cry.

La sintomatología que presentan las larvas de insectos susceptibles por efecto de los cristales y esporas de Bt son: cese de ingesta, parálisis del intestino, vómito, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte (Aronson *et al.*, 1986). La larva inerte presenta un color negro característico de la enfermedad. Por estudios histopatológicos se ha demostrado que las células columnares del intestino medio son las estructuras afectadas inicialmente, y en particular la microvellosidad apical, que se destruye en su totalidad (Ebersold *et al.*, 1978; Percy *et al.*, 1983).

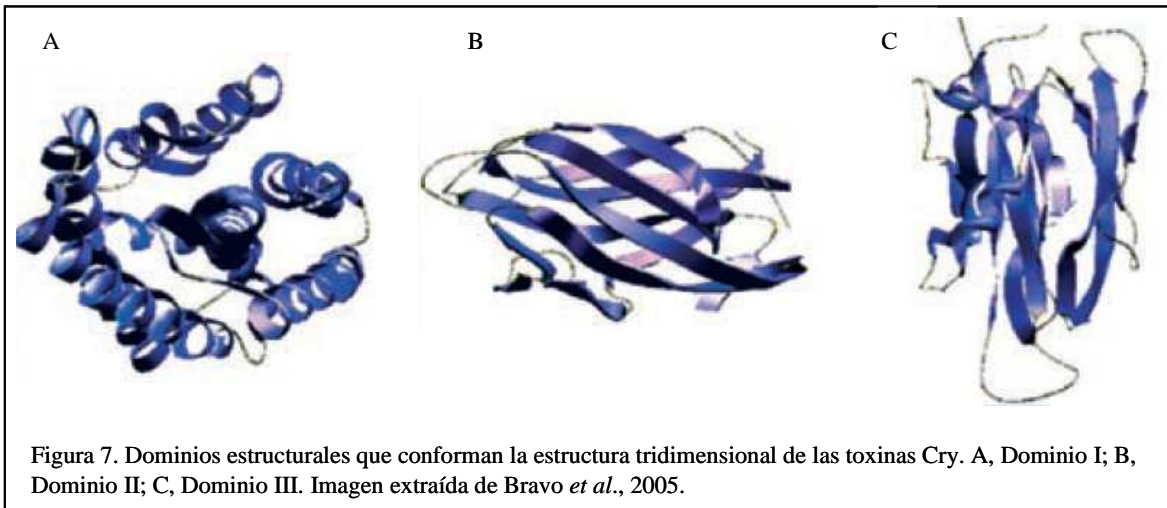
Las proteínas Cry son sintetizadas como protoxinas inactivas, las cuales, después de ser ingeridas por el insecto blanco, son solubilizadas en su intestino medio y activadas por proteasas digestivas. Las toxinas activadas se unen a receptores específicos de la membrana de la microvellosidad apical de las células del intestino (Bravo *et al.*, 1992), creando poros transmembranales que causan el rompimiento de la célula por un proceso de lisis osmótica (Knowles y Ellar, 1987).

### 2.4.1 Estructura de las toxinas Cry.

A la fecha se ha elucidado la estructura cristalográfica de seis toxinas Cry: **Cry3Aa** (Li *et al.*, 1991) y **Cry3Bb** (Galitsky *et al.*, 2001) con especificidad hacia coleópteros; **Cry1Aa** (Grochulski *et al.*, 1995) con especificidad hacia lepidópteros; **Cry4Aa** y **Cry4Ba** con actividad hacia dípteros (Boonserm *et al.*, 2005, 2006) y **Cry2Aa** (Morse *et al.*, 2001) con actividad dual contra dípteros y lepidópteros (Figura 6). Estas estructuras difieren en algunas regiones a detalle, pero muestran un plegamiento común consistente de tres dominios globulares constituidos cada uno por cerca de 200 aminoácidos.



El dominio I es un racimo de siete  $\alpha$ -hélices antiparalelas y anfipáticas, donde seis de ellas rodean a la hélice  $\alpha$ -5 (Figura 7A). Este dominio es el responsable de la inserción en la membrana y la formación del poro iónico (Li *et al.*, 1991; Grochulski *et al.*, 1995). El dominio II es un prisma de tres hojas  $\beta$ -plegadas antiparalelas (Figura 7B), que está involucrado en unión a receptor y especificidad hacia el insecto blanco (Ge *et al.*, 1989; Schnepf *et al.*, 1990; Smith y Ellar, 1994; Smedley y Ellar, 1996; Morse *et al.*, 2001). Por su parte, el dominio III consiste de dos láminas  $\beta$  antiparalelas formando un  $\beta$ -sandwich (Figura 7C). Este dominio también participa en la determinación de la especificidad (Lee *et al.*, 1995; de Maagd *et al.*, 1996; Burton *et al.*, 1999) y posiblemente en la regulación de actividad de canales iónicos (Chen *et al.*, 1993; Wolfersberger *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 1997).



#### 2.4.2 Mecanismo general de acción de las toxinas Cry en insectos lepidópteros.

El mecanismo molecular de acción de las toxinas Cry ha sido caracterizado principalmente en insectos lepidópteros. Como se mencionó previamente, la acción primaria de las toxinas Cry es lisar las células epiteliales del insecto blanco a través de la formación de poros en la microvellosidad apical del intestino medio (Aronson y Shai, 2001; de Maagd *et al.*, 2001, Bravo *et al.*, 2005). No obstante, se ha sugerido recientemente que la toxicidad podría estar también relacionada con la activación de una vía apoptótica guiada por la activación de proteína G y regulada por la unión a receptor localizado en el intestino (Zhang *et al.*, 2006). Nuestro grupo de investigación no descarta la anterior afirmación, sin embargo, sostenemos que las proteínas Cry una vez en su estado de protoxinas solubles, son capaces de formar oligómeros estables que puede insertarse en membrana, generar un desbalance osmótico a través de un fenómeno de lisis celular y por último diseminar a través del organismo guiando al insecto a una muerte por inanición y septicemia (de Maagd *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2005).

Por todo lo anterior, podemos decir que el mecanismo de acción de las toxinas Cry involucra 5 pasos principales:

- 1) Solubilización y procesamiento de las protoxinas Cry.
- 2) Unión a receptor en células columnares del intestino medio del insecto blanco.

- 3) Formación de una estructura de pre-poro u oligómero.
- 4) Inserción en membrana.
- 5) Citólisis.

#### 2.4.2.1 Solubilización y procesamiento de las protoxinas Cry.

Los cristales producidos por Bt se solubilizan a pH alcalino liberando a la protoxina en un medio reductor (Gringorten *et al.*, 1992). Las proteínas Cry se producen como protoxinas, que para ser activas, deben ser procesadas por las proteasas del intestino medio de los insectos. El procesamiento típico de las toxinas Cry1 se da por el corte de los primeros 28 residuos del extremo N-terminal en un sitio conservado (Bravo *et al.*, 2002) y de los últimos 500 residuos del extremo C-terminal, obteniéndose un fragmento resistente a proteasas de entre 60 y 70 kDa que es la toxina activa (Bravo *et al.*, 2005). La posición del sitio de corte en el extremo C-terminal no es constante en todas las toxinas Cry sino que se localiza en la región entre los residuos 609 y 630 (Wabiko *et al.*, 1986; Martens *et al.*, 1995; Strizhov *et al.*, 1996). La toxina, una vez procesada, se une a receptores específicos localizados en la microvellosidad apical del intestino medio, (de Maagd *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2005) siendo este fenómeno el catalizador del evento de lisis celular que guía a la posterior muerte del insecto (Aronson y Shai, 2001; Bravo *et al.*, 2005).

#### 2.4.2.2 Unión de las toxinas Cry a su receptor.

Las toxinas Cry se unen a sitios específicos localizados en la microvellosidad apical de las células columnares del intestino medio de larvas de insectos susceptibles (Hofmann *et al.*, 1988; Bravo *et al.*, 1992). Dicha unión es determinante para la toxicidad, y gracias a estudios con larvas de lepidópteros y toxinas de tipo Cry1 (Pietrantonio *et al.*, 1996) se ha mostrado que la cinética de unión de dichas toxinas a vesículas de membrana en la microvellosidad apical (VMMA) es bifásica, compuesto de un paso reversible y otro irreversible (Van Rie *et al.*, 1989; Jenkins *et al.*, 2000).

Las regiones de la toxina que participan en la interacción con el receptor se localizan en los dominios II y III, primordialmente, en las asas expuestas de dichos dominios. Estas regiones han sido identificadas por medio de análisis de mutantes sitio-

dirigidas (Lee *et al.*, 1996), con las cuales se observó que la etapa inicial de la interacción con el receptor es un proceso reversible producido por proteínas con menor afinidad y con menor toxicidad, como las realizadas en el asa 2 de la toxina Cry1Ac (Dean *et al.*, 1996). Otras mutaciones causan cambios en la segunda etapa de la interacción con el receptor (unión irreversible) conduciendo también a una baja toxicidad, como las realizadas en el asa 1 de Cry1Ac (Smedley y Ellar, 1996).

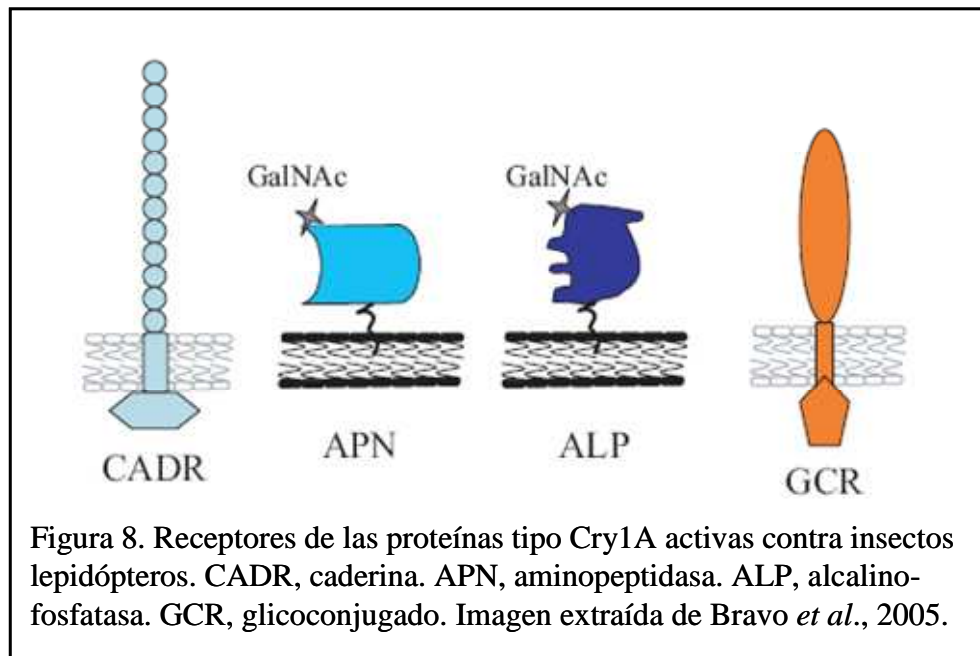
Para toxinas tipo Cry1A activas contra insectos lepidópteros, se han reportado al menos cuatro diferentes proteínas que tienen la función de receptores (Figura 8): 1) una proteína tipo caderina (CADR); 2) una aminopeptidasa (APN) anclada a membrana a través de un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI); 3) una fosfatasa alcalina (ALP) anclada a membrana a través de un grupo GPI; 4) y un glicoconjugado (GCR) de 270 kDa (Vadlamudi *et al.*, 1995; Knight *et al.*, 1994; Jurat-Fuentes y Adang, 2004; Valaitis *et al.*, 2001).

- *Caderina.*

Las caderinas son proteínas transmembranales con un dominio citoplasmático y un ectodominio extracelular formado por varias subunidades proteicas de aproximadamente 100 aminoácidos cada una (Vadlamudi *et al.*, 1995). Forman una de las superfamilias de proteínas más diversa, ya que desarrollan una gran variedad de funciones, que involucran desde adhesión celular hasta organización del citoesqueleto y morfogénesis (Angst *et al.*, 2001; Gumbiner, 1996). En 1993, un nuevo tipo de caderina fue aislada del epitelio intestinal del lepidóptero *Manduca sexta*, debido a la capacidad que presentó para unir a la proteína Cry1Ab (Vadlamudi *et al.*, 1993). Dicha glicoproteína de 210 kDa y 12 repetidos extracelulares proteicos, fue clonada en 1995 y nombrada Bt-R1 (Vlamudi *et al.*, 1993; Dorsch *et al.*, 2002). Esta proteína mostró un 30-60% de similitud y un 20-40% de identidad con otros miembros de la superfamilia de las caderinas (Vadlamudi *et al.*, 1995). No obstante, esta proteína se localiza en la superficie apical de las células columnares del intestino de *M. sexta*, a diferencia de las caderinas tradicionales, que por lo general, están presentes en las uniones que involucran la adhesión célula-célula (Aimanova *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2005; Hara *et al.*, 2003; Midboe *et al.*, 2003). Por lo anterior, se intuye que Bt-



R1 presenta una función específica y diferenciada en comparación con otros miembros de la superfamilia de las caderinas.



Fue por medio de experimentos de unión a través del uso de la técnica de *surface plasmon resonance*, que se demostró que la toxina Cry1A en estado monomérico podía unirse al receptor Bt-R1 con una constante de disociación de 1 nM (Vadlamudi *et al.*, 1995). Este dato, aunado a la expresión de Bt-R1 en líneas celulares de mamíferos (como COS-7 y HEK-293), permitió el análisis de la unión de la toxina mediante otras técnicas bioquímicas como ensayos tipo ligand blot (Vadlamudi *et al.*, 1995). Además, cuando se expresó a BT-R1 en líneas celulares de insectos lepidópteros (Sf21 y H5), se demostró la capacidad de unión y toxicidad de las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac, pero no la de Cry3Aa y Cry11Aa, las cuales, naturalmente no son tóxicas hacia este tipo de insectos (Keeton y Bulla, 1997; Zhang *et al.*, 2006). Este dato no sólo validó a Bt-R1 como receptor específico de las toxinas tipo Cry1A, sino también estableció una importante relación entre el evento de unión y la actividad de la toxina.

La interacción de las toxinas tipo Cry1A al receptor Bt-R1 es un evento complejo que involucra, al menos, 3 sitios de unión en ambas moléculas. Concretamente, Gómez y colaboradores, a través del uso de una biblioteca de fagos, caracterizaron un anticuerpo anti-scFv (scFv73) que es capaz de unir al dominio II de las toxinas Cry1A. Dicho anticuerpo inhibe específicamente la unión de las toxinas Cry1A a Bt-R1, y gracias a su uso en ensayos de competencia, se pudieron identificar tres regiones de unión de Bt-R1 hacia la toxina Cry1Ab: **repetido 8** localizado en el asa 2 del dominio II (Gómez *et al.*, 2001, 2002a); **repetido 11**, localizado en el asa  $\alpha 8$  ( $\alpha 8a$ – $\alpha 8b$ ) del dominio II (Gómez *et al.*, 2003) y **repetido 12** (residuos 1363–1464), el cual se localiza en el asa 3 del dominio II y que mostró estar altamente involucrado en la toxicidad de Cry1Ab (Hua *et al.*, 2004). Todos estos resultados de forma conjunta, demuestra que las toxinas Cry1A se pueden unir de forma específica al receptor Bt-R1 cuando éste se encuentra expresado tanto endógena como exógenamente.

Además de Bt-R1 en *M. sexta*, a la fecha se han reportado otras proteínas tipo caderinas que sirven como receptores de toxinas Cry1A en otros insectos lepidópteros, como serían **BtR175** en *Bombyx mori* (glicoproteína de 175 kDa que une específicamente a Cry1Aa) y **HevCALP** en *Heliothis virescens*. Todas estas proteínas muestran un tipo de organización similar a Bt-R1, su porcentaje de identidad con dicho receptor es del 70% y su validez como receptores ha sido ampliamente documentada a través del uso de diferentes técnicas (Flanagan *et al.*, 2005; Gaham *et al.*, 2001; Morin *et al.*, 2003; Nagamatsu *et al.*, 1998 y Wang *et al.*, 2005). En particular, HevCALP es importante debido a que el único caso de resistencia a las toxinas Cry que se ha encontrado en campo, está estrechamente relacionado a mutaciones en dicho receptor (Ferré y Van Rie, 2002).

#### - *Aminopeptidasa.*

Las aminopeptidasas (APN's) son una familia de enzimas que cortan de forma natural aminoácidos a partir del extremo N-terminal. Por lo general tienen una gran variedad de funciones, pero en el intestino de los insectos lepidópteros trabajan conjuntamente con endopeptidasas y carboxipeptidasas para digerir proteínas derivadas de la dieta de los insectos (Wang *et al.*, 2005). Además de sus propiedades en la digestión, las

APN's han sido estudiadas por su habilidad como receptores de las toxinas Cry. De hecho, desde que se demostró que estas proteínas pueden unir dichas toxinas, muchas formas diferentes de APN's han sido aisladas y caracterizadas, aunque no todas han mostrado tener importancia en la susceptibilidad de la toxina sobre el insecto blanco (Sangadala *et al.*, 1994; Knight *et al.*, 1994).

Hoy en día se conocen cinco diferentes clases de APN's (Herrero *et al.*, 2005). La clase 2 es la menos parecida a las otras clases, con un porcentaje de identidad en secuencia de solo 25-26%, mientras que la clase 1 y 3 son las más similares con un porcentaje de identidad de 38%. No obstante lo anterior, todas las APN's comparten un grupo de características similares, como serían un peso molecular de 90 a 170 kDa, el que tengan un péptido señal en el extremo N-terminal que dirige al polipéptido naciente a la superficie externa de la membrana citoplasmática y el que todas estén ancladas a membrana a través de un grupo GPI (Agrawal *et al.*, 2002; Denolf *et al.*, 1997; Knight *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1996, Takesue *et al.*, 1992).

En cuanto a su función como receptor de las toxinas Cry, la interacción más estudiada a la fecha es la de la APN de 120 kDa de *M. sexta* y la toxina Cry1Ac. Esta toxina interacciona con APN a través del dominio III. El primer indicio de que APN podría funcionar como su receptor surgió a partir de un experimento tipo ligand blot, que generó la identificación de una proteína de 120 kDa, que fue posteriormente purificada usando para ello una columna de afinidad para Cry1Ac, la cual requirió de la presencia del azúcar N-acetilgalactosamina (GalNAc) para su elusión, demostrándose así que dicho azúcar es indispensable para la unión de Cry1Ac con APN (Knight *et al.*, 1994; Sangandala *et al.*, 1994). Posteriormente se mapearon las regiones de interacción de Cry1Ac a APN por mutagénesis sitio-dirigida, observándose que la toxina se une al receptor a partir de dos regiones (asas 2 y 3 del dominio II), una de las cuales se comparte con las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab. No obstante, la diferencia entre la unión de estas toxinas, es que la interacción de la APN con Cry1Aa y Cry1Ab no se inhibe en presencia de GalNAc como con Cry1Ac (Masson *et al.*, 1995). Además de lo anteriores experimentos, también se ha probado la interacción de la toxina Cry1Ac y la proteína APN expresada exógenamente en líneas

celulares de *Drosophila melanogaster*, lo que sustenta el papel de dicha proteína no sólo como receptor de la toxina sino también como un regulador de su actividad (Gill y Ellar, 2002).

- *Alcalino-fosfatasa.*

Las proteínas tipo alcalino-fosfatasa (ALP's) también han sido identificadas como receptores de las toxinas Cry. No obstante, el trabajo que se ha realizado con este receptor es mínimo comparado con lo que se ha hecho con los receptores CADR y APN. Por estudios preliminares se ha sugerido que ALP puede actuar como receptor de la toxina Cry1Ac en *M. sexta* (McNall y Adang, 2003; Sangandala *et al.*, 1994) y *H. virescens* (Engh *et al.*, 1996; Jurat-Fuentes y Adang, 2004). En este último caso, la ALP identificada es una glicoproteína de 68 kDa anclada a membrana por un grupo GPI (Jurat-Fuentes y Adang, 2004), cuya unión a la toxina Cry1Ac fue demostrada mediante un análisis tipo ligand blot usando VMMA de *H. virescens* en presencia de GalNAc. Es interesante mencionar que se ha demostrado que el fenotipo de la línea resistente de *H. virescens* (YHD2) a Cry1Ac, se debe a mutaciones que generan una producción reducida del receptor ALP (Jurat-Fuentes y Adang, 2004), lo que sería el primer indicio contundente para darle a esta proteína el título de receptor. Por otra lado, en *M. sexta* también se ha identificado una ALP importante en la unión de la toxina Cry1Ac, esto a través de un análisis proteómico usando VMMA de este lepidóptero (McNall y Adang, 2003). Esta metodología abre una nueva brecha de estudio para poder identificar proteínas con potencial importante en el mecanismo de acción de las toxinas Cry.

- *Glicoconjugado.*

Por estudios preliminares se ha demostrado que las toxinas Cry son capaces de unirse a dos tipos adicionales de receptores. El primero es un glicoconjugado de 270 kDa aislado de *Limantria dispar* al que se le ha denominado BTR-270, el cual, muestra una fuerte unión con las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ba (Valaitis *et al.*, 2001). Este receptor ha sido difícil de caracterizar, no obstante, parece ser una proteína aniónica altamente glicosilada que forma parte del glicocáliz de las VMMA de *L. dispar*. El otro receptor llamado P252, fue aislado de un fracción soluble de Tritón X-100 derivada de VMMA de

*B. mori* (Hossain *et al.*, 2004). P252 tiene un peso aproximado de 252 kDa, sin embargo, por cromatografía de filtración en gel, se purificó una estructura oligomérica de 985 kDa. Este receptor purificado une a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac bajo condiciones desnaturalizantes, pero su importancia en la susceptibilidad de la toxina a sus células blanco aun no se ha reportado.

#### 2.4.2.3 Formación de una estructura de pre-poro u oligómero.

Como se mencionó previamente, la mayoría de las toxinas formadoras de poro producidas por bacterias, antes de insertarse en membrana forman una estructura oligomérica altamente organizada y estable, como sería el caso de la aerolisina de *Aeromonas hydrophila* (Abrami *et al.*, 2000a), la  $\alpha$ -toxina de *Staphylococcus aureus* (Valeva *et al.*, 1996), la neumolisina de *Streptococcus pneumoniae* (Gilbert *et al.*, 1999) y la  $\alpha$ -toxina de *Clostridium septicum* (Melton *et al.*, 2004). De hecho, en muchas de estas toxinas, se propone que la interacción con el receptor induce un cambio conformacional, que acompañado por un corte proteolítico por una proteasa asociada a membrana, promueve eventos de oligomerización para generar una forma activa y eficiente de inserción en membrana. En el caso de la toxina Cry1Ab, la unión a Bt-R1 de *M. sexta* promueve un corte proteolítico adicional en el extremo N-terminal (hélice  $\alpha$ 1), facilitando la formación de un oligómero o pre-poro que es fundamental para la inserción en membrana y la toxicidad (Gómez *et al.*, 2002b; Rausell *et al.*, 2004a).

Experimentalmente, la forma en que se observó dicho oligómero, fue mediante la incubación de la protoxina de Cry1Ab con el anticuerpo scFv73 que mimetiza el sitio de unión a Bt-R1 ó con péptidos sintéticos que mimetizan los sitios de unión de dicho receptor hacia la toxina, todo en presencia de jugo gástrico de *M. sexta*. Este proceso generó la formación de un tetrámero de 250 kDa que carece de la hélice  $\alpha$ -1 del dominio I (Gómez *et al.*, 2002b y 2003; Soberón *et al.*, 2007). Posteriormente se reportó que dicha estructura oligomérica, incrementó su afinidad por el receptor APN de 100 a 200 veces, mostrando una constante de disociación aparente de 0.75 a 1 nM (Gómez *et al.*, 2003; Pardo-López *et al.*, 2006). Además, el oligómero demostró ser más competente que el monómero para insertarse en membrana, esto a través de experimentos de inserción basados en el análisis

de la fluorescencia intrínseca de grupos triptófanos y a través de ensayos de formación de poro usando bicapas lipídicas planas (Rausell *et al.*, 2004a).

El resultado anterior fue un parteaguas en el entendimiento del mecanismo molecular de acción de las toxinas tipo Cry1A, y a la fecha, se ha reportado la existencia de otras estructuras de pre-poro para otros tipos de toxinas Cry, como serían: Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fa y Cry3 (Gómez *et al.*, 2002b; Rausell *et al.*, 2004a, 2004b; Muñoz-Garay *et al.*, 2006). En todos los casos, los oligómeros muestran una alta actividad de formación de poro en contraste con las muestras monoméricas, que generan una actividad de tipo marginal, lo que sustenta la hipótesis de que la formación del pre-poro es un paso necesario y decisivo en el mecanismo de acción de las toxinas Cry.

Además de lo anterior, recientemente se observó que la hélice  $\alpha 3$  localizada en el dominio I de la toxina Cry1Ab es capaz de formar estructuras denominadas “coiled-coils” ó zippers de leucina, los cuales son dominios importantes en el plegamiento natural de las proteínas (Chothia *et al.*, 1981). Estas estructuras tipo coiled-coils se forman gracias a la interacción de 2 a 5  $\alpha$ -helices, y están involucradas en la oligomerización de diversas proteínas y en la estabilidad termodinámica de dichos oligómeros (Burkhard *et al.*, 2001). A través de mutagénesis sitio-dirigida sobre la hélice  $\alpha 3$  de la toxina Cry1Ab, se obtuvieron proteínas mutantes que pueden unirse al receptor Bt-R1 tal y como hace la proteína silvestre, pero que están afectadas en su proceso de oligomerización, dando como resultado la pérdida total de su actividad formadora de poro y la nula toxicidad en larvas de *M. sexta*. Estos resultados indican que el estado de pre-poro que experimenta la toxina Cry1Ab antes de insertarse en membrana, es un intermediario indispensable y necesario en el proceso final de intoxicación que presente la larva, dándole así una relevancia contundente al proceso de oligomerización.

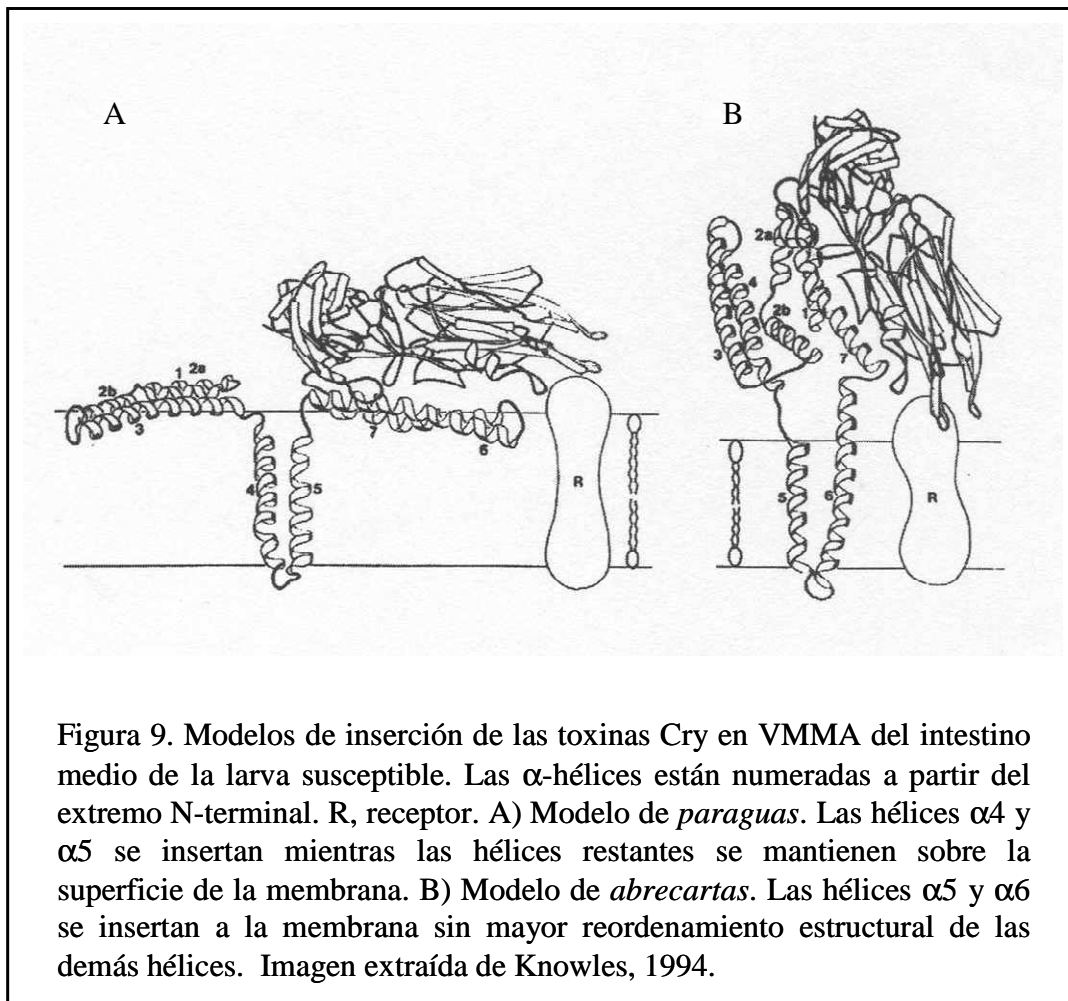
#### 2.4.2.4 Inserción en membrana y formación de poro

La fase irreversible de la unión de las proteínas Cry a la membrana se considera como una evidencia de que éstas se insertan en ella para luego causar la destrucción del tejido intestinal de las larvas de insectos susceptibles (Van Rie *et al.*, 1989; Jenkins *et al.*,

2000). Se ha demostrado que a dosis de micromolar las toxinas Cry son capaces de interactuar con membranas lipídicas artificiales en ausencia de receptor e insertarse en las mismas, formando canales permeables principalmente a cationes (English *et al.*, 1991). No obstante, a concentraciones fisiológicamente relevantes (pM-nM), las proteínas Cry no se insertan de manera espontánea en membranas artificiales (Knowles, 1994; Lorence *et al.*, 1995) lo que le da al proceso de formación de poro una validez biológica en el mecanismo de acción de las toxinas Cry.

Actualmente, con la identificación de la estructura oligomérica de las toxinas Cry, la visión que se tiene sobre la forma en que las toxinas se insertan en membrana, ha cambiado drásticamente. Hoy en día, se sabe que la actividad formadora de poro del oligómero de Cry1Ab en bicapas lipídicas planas, presenta dos diferentes características cinéticas relevantes entre el pre-poro y el estado monomérico de la toxina. La primera muestra que el oligómero puro es capaz de inducir formación de poro con una concentración mucho menor de toxina que la que se necesita con el monómero; y la segunda recalca que el oligómero puro de Cry1Ab es capaz de generar lecturas de canales estables que tiene una alta probabilidad de apertura en contraste con el inestable patrón de apertura y cierre que muestra el monómero (Rausell *et al.*, 2004a).

Por todo lo anterior, los modelos de inserción reportados para las toxinas Cry han variado notablemente. Con la toxina en su forma monomérica, se propusieron dos modelos de inserción en membrana. El primer modelo llamado de “*abrecartas*” (Figura 9B), propone que las  $\alpha$ -hélices 5 y 6 se insertan en la membrana como consecuencia de un cambio conformacional regulado por el receptor, sin mayor participación de las hélices y dominios restantes. El otro modelo, denominado de “*paraguas*” (Figura 9A), plantea que después de la unión con el receptor, se inserta la región de las hélices  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5, mientras que el resto de las hélices se aplanan sobre la superficie de la bicapa lipídica exponiendo hacia ella su cara hidrofóbica (Knowles, 1994). Hasta el momento, más evidencias sustentan el modelo de paraguas (Schwartz *et al.*, 1997; Masson *et al.*, 1999).



En cuanto a la forma de inserción de las toxinas Cry en su forma de oligómero, ya se sabía, por experimentos de protección osmótica, que estas toxinas formaban poros con un diámetro de 1 a 2 nm (Knowles y Ellar, 1987). El tamaño de estos poros aunado a la aparición frecuente de múltiples estados de conductancia en los estudios de la actividad de las proteínas Cry en bicapas lipídicas planas (Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1993; Grochulski *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1997) evidenciaron la formación de agregados de las  $\delta$ -endotoxinas. De hecho, se postuló que se requieren de cuatro toxinas Cry para formar un poro en donde las hélices  $\alpha 4$  y  $\alpha 5$  se encuentran insertadas en la membrana (Schwartz *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 2002b). Hoy en día se han hecho otro tipo de consideraciones



respecto a este rubro, como la importancia de los lípidos preponderantes en las células columnares del intestino para la inserción de la toxina. En el caso de las toxinas tipo Cry1A, se sabe que después de ser incubadas con VMMA, las toxinas tienden a asociarse con microdominios lipídicos o balsas de membrana denominados “rafts”, que se definen como aquellos lípidos insolubles en detergente que están enriquecidos en colesterol, esfingolípidos y proteínas ancladas a membrana por un grupo GPI (Simons y Toomre, 2000). Dichos microdominios son esenciales para la actividad de formación de poro de la toxina Cry1Ab *in vitro* (Zhuang *et al.*, 2002). El receptor Bt-R1 está localizado en la fracción soluble de membrana, a diferencia de APN y ALP, los cuales se encuentran enriquecidos en rafts (Zhuang *et al.*, 2002). Los insectos lepidópteros *H. virescens* y *M. sexta*, al igual que muchos mamíferos, presentan en sus células intestinales zonas en las que se encuentran microdominios de membrana tipo rafts (Zhuang *et al.*, 2002). A estas regiones se les asocia con el tráfico de membrana para la activación de diversas vías de transducción de señales, además de catalogarse como los sitios de entrada de la célula para virus, bacterias y toxinas (Simons y Toomre, 2000).

En el caso de las PFT, se sabe que estas toxinas, la mayoría de las veces, interaccionan con receptores localizados en rafts como parte de su mecanismo de acción, y este paso es crucial para la oligomerización e inserción de la toxina dentro de la membrana (Cabiaux *et al.*, 1997). En el caso de las toxinas tipo Cry1A, se ha demostrado que el receptor APN está implicado en su inserción, esto a partir de experimentos donde se promueve el corte de las proteínas ancladas a membrana por un grupo GPI a partir del uso de fosfolipasa C, lo que genera un decremento sustancial en los niveles de oligómero presentes en fracción soluble y una drástica disminución en la actividad formadora de poro de la toxina Cry1Ab (Bravo *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado la incorporación de APN en bicapas lipídicas planas, lo que genera el incremento en la actividad de formación de poro de la toxina Cry1Aa (Schwartz *et al.*, 1997).

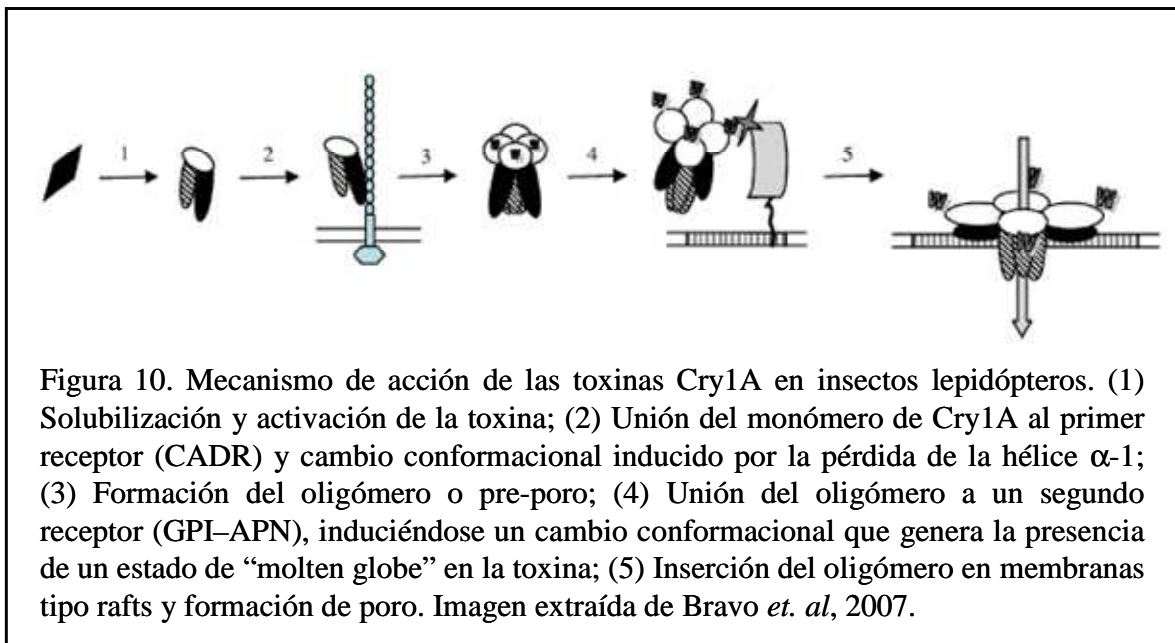
Con el uso de la técnica de análisis de la fluorescencia intrínseca de los grupos triptófanos presentes en la toxina, se han logrado observar cambios estructurales después de que el oligómero de Cry1Ac se une a APN. Con ello se demostró no sólo que el azúcar

GalNAc es determinante para su interacción (Pardo-López *et al.*, 2006), sino que los cambios conformacionales que experimenta la toxina favorecen su inserción dentro de la membrana (Pardo-López *et al.*, 2006). De hecho, previamente se había propuesto que las proteínas deben estar parcialmente desplegadas para facilitar su inserción en membrana y la formación de poro. En el caso de las PFT activas contra células de mamíferos, dicho desplegamiento se ve generalmente catalizado por un pH ácido (Parker and Feil, 2005), que se encuentra principalmente en compartimentos de membrana y también en la superficie de la células, donde el pH puede ser dos unidades menor del promedio general (Parker and Feil, 2005). En contraste, en insectos lepidópteros y dípteros (mosquitos) el pH preponderante en la zona del lumen intestinal es básico (11 o superior) (Dow, 1986). Rausell y colaboradores, demostraron por análisis de desplegamiento en la toxina Cry1Ab a diferentes pH que la presencia de un estado de “molten globe” ó relajamiento de la estructura del oligómero, se ve favorecido por un pH alcalino y no ácido. Estos análisis mostraron además que la estructura de pre-poro y el oligómero insertado en membrana, son más flexibles que la toxina en su forma monomérica (Rausell *et al.*, 2004a), y aunque hoy en día no se ha determinado que dicho cambio esté vinculado con la presencia del estado de “molten globe”, es indiscutible que la interacción del tetrámero con el receptor a pH básico facilita su inserción (Pardo-López *et al.*, 2006).

Basado en los datos anteriores, se postula que el mecanismo de acción de las toxinas tipo Cry1A (Figura 10) involucra la interacción secuencial de dichas proteínas con los receptores Bt-R1 y APN. El primer paso involucra la interacción de las toxinas tipo Cry1A con Bt-R1, lo que desencadena la formación de una estructura de pre-poro que pierde afinidad por caderina y gana afinidad por un segundo receptor, APN, induciéndose así un nuevo cambio conformacional a partir de un estado de “molten globe”, que favorece la inserción de dicha estructura en membrana y el proceso de formación de poro (Bravo *et al.*, 2004).

#### 2.4.2.5. Citólisis

Las toxinas Cry causan la muerte de las células epiteliales por citólisis osmótica. Las toxinas Cry aumentan la permeabilidad de la microvellosidad apical a cationes, aniones, agua y moléculas de mayor tamaño. Esto genera que se colapse la diferencia de potencial y por tanto se pierda la fuerza motriz que dirige la entrada de aminoácidos al interior celular, así como la redistribución de los cationes entre el lumen y el citoplasma. Se considera que un efecto devastador en este proceso es la alcalinización del citoplasma, ya que esto interfiere con el metabolismo celular normal, que tiene como consecuencia final la destrucción del epitelio intestinal. Una vez que las células se destruyen, las esporas de Bt tienen acceso al hemolinfa, medio en el que proliferan. La consecuencia final de la destrucción del intestino medio y la proliferación de bacterias de la hemolinfa desemboca en la muerte de las larvas por inanición y septicemia (Knowles y Ellar, 1987).



#### 2.4.3 Mecanismo general de acción de las toxinas Cry en insectos dípteros.

Como se mencionó previamente, las toxinas Cry activas contra larvas de mosquitos y producidas por Bti (Cry11Aa, Cry4Aa y Cry4Ba) poseen una estructura tridimensional similar a las toxinas Cry1A activas contra lepidópteros, lo que sugiere que su mecanismo de acción podría ser similar. Al igual que en los insectos lepidópteros, las larvas de los mosquitos ingieren los cristales promoviendo su solubilización en un ambiente alcalino y

reductor, característico del intestino de dípteros. En el caso de la proteína Cry11Aa, la protoxina soluble tiene un peso molecular aproximado de 70 kDa a diferencia de la forma tóxica que al sufrir un corte intramolecular por las proteasas propias del insecto pierde 28 residuos del extremo N-terminal y genera dos fragmentos importantes de 36 y 32 kDa que permanecen unidos en su forma nativa por interacciones hidrofóbicas (Dai y Gill, 1993), los cuales son indispensables para su toxicidad (Yamagiwa *et al.*, 2004, 2002, 1999). En el caso de la toxina Cry4Ba se sabe que la proteólisis *in vitro* ocurre en el asa que conecta a la lámina  $\beta$ -5 con la hélice  $\alpha$ -6 de la toxina, lo que genera la formación de dos fragmentos de 47 kDa que permanecen unidos por interacciones hidrofóbicas y un fragmento de 21 kDa. Este tipo de procesamiento es clave para la actividad citolítica *in vitro* de la toxina Cry4Ba en líneas celulares de *Ae. aegypti*, así como para su toxicidad contra estos mismos insectos *in vivo* (Angsuthanasombat *et al.*, 1993; Komano *et al.*, 1998).

En cuanto al mecanismo de unión de las toxinas Cry, se ha propuesto que las asas expuestas del dominio II en las toxinas Cry4Aa, Cry4Ba y Cry11Aa están directamente involucradas en su interacción a receptor y en la especificidad de la toxina. En este último apartado en particular, se sabe que la toxina Cry4Ba muestra toxicidad nula contra mosquitos del género *Culex* en contraste con la toxina Cry4Aa que es tóxica para ellos. No obstante, por experimentos de mutagénesis en el asa 3 del dominio II de Cry4Ba, se logró mimetizar dicha asa con la de la toxina Cry4Aa, introduciendo así toxicidad hacia mosquitos del género *Culex* (Abdullah *et al.*, 2003). De forma contraria, al mutagenizar las asas 1 y 2 de la toxina Cry4Ba se suprimió la toxicidad a larvas de *Aedes* y *Anopheles* (Abdullah *et al.*, 2003), puntualizando que las regiones expuestas en el dominio II de las toxinas Cry son determinantes para la especificidad de la toxina. Además de lo anterior, es importante mencionar que recientemente se demostró que rediseñando las asas expuestas del dominio II de la toxina Cry1Aa tomando como modelo Cry4Ba, se obtuvo una quimera de Cry1Aa que fue medianamente tóxica contra larvas de *Cx. pipiens* (Liu y Dean, 2006). Este dato abre la posibilidad de pensar que en el futuro se podrán diseñar toxinas Cry capaces de contender con procesos de resistencia no importando el insecto blanco para el que originalmente sean tóxicas.

En el caso de la toxina Cry11Aa las asas del dominio II también son importantes en su unión a receptor. Concretamente se sabe por ensayos de competencias en unión usando péptidos sintéticos correspondientes a las asas expuestas del dominio II, que las asas  $\alpha 8$ , la lámina  $\beta 4$  y el asa 3 son importantes en la interacción de la toxina con las VMMA de *Ae. aegypti*. Además, al realizar mutagénesis sobre el asa  $\alpha 8$  se confirmó que dicha región es vital en la interacción de Cry11Aa con su receptor localizado en las VMMA de *Ae. aegypti* y con su toxicidad (Fernández *et al.*, 2005).

En cuanto a la identificación de los receptores localizados en VMMA, el primer dato que se obtuvo fue que las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba, se unían a proteínas de pesos aproximados de 65 y 62 kDa en VMMA de larvas *Ae. aegypti*, esto a partir de ensayos tipo ligand blot (Buzdin *et al.*, 2002). Trabajo reciente, demostró que en realidad existen tres proteínas capaces de unir a la proteína Cry11Aa con pesos moleculares aproximados de 200, 100 y 65 kDa, sugiriendo la presencia de más de un posible receptor para esta toxina en membranas de mosquitos. Dos de estas proteínas, la de 100 kDa y la de 65 kDa, están ancladas a membrana a través de un grupo GPI (Fernández *et al.*, 2006). No obstante, después de un proceso de purificación por cromatografía de afinidad, sólo la proteína de 65 kDa fue obtenida. Esta proteína se identificó como una ALP (Fernández *et al.*, 2006). Que está vinculada directamente en la toxicidad de Cry11Aa. Dos fagos que despliegan la toxina Cry11Aa, P1.VMMA y P8.VMMA, unen específicamente a la ALP de 65 kDa, compiten la unión de la toxina en VMMA e interfieren en la toxicidad de la proteína (Fernández *et al.*, 2006). Todos estos resultados, en conjunto, muestran que ALP es un receptor importante que media la actividad tóxica de Cry11Aa en larvas de *Ae. aegypti*.

En otros mosquitos como *Anopheles quadrimaculatus*, también se han identificado posibles receptores para las toxinas Cry, concretamente se observó unión de Cry11Ba a una APN anclada a membrana por un grupo GPI (Abdullah *et al.*, 2006). Esta APN une a Cry11Ba con alta afinidad pero no interacciona con Cry4Ba o Cry11Aa, lo que posiblemente explique la diferencia en toxicidades que presentan estas toxinas en esta especie en particular, pues Cry11Ba es 100 veces más tóxica que las otras toxinas contra este mismo mosquito (Abdullah *et al.*, 2006).

Como hemos visto hasta ahora, al igual que en insectos lepidópteros, existen muchos receptores para toxinas Cry en insectos dípteros, y muchos de estos están anclados a membrana a través de un grupo GPI como es el caso de ALP y APN (Fernández *et al.*, 2006; Abdullah *et al.*, 2006). Además, en otro tipo de toxinas activas contra mosquitos como las toxinas binarias (Bin) producidas por *B. sphaericus*, también se ha identificado una proteína anclada a membrana por GPI que funcionaría como posible receptor. Esta es una  $\alpha$ -glucosidasa que mostró ser funcional en *Cx. pipiens* (Darboux *et al.*, 2001), y dado que esta proteína y las anteriores, parecen estar enriquecidas en regiones tipo rafts, podemos decir que al igual que otras PFT, las toxinas Cry activas contra insectos dípteros prefieren este tipo de membranas para llevar a cabo su mecanismo de acción.

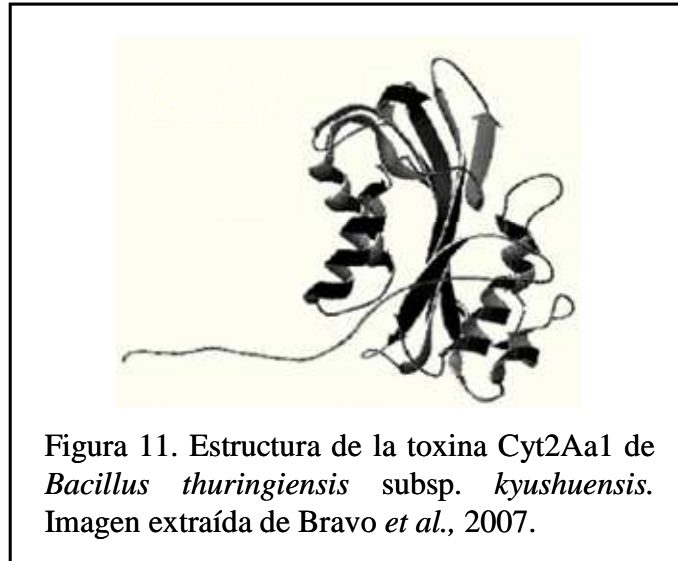
## 2.5 Proteínas Cyt.

Como ya se mencionó con anterioridad, las proteínas Cyt son un subgrupo de las  $\delta$ -endotoxinas cristalinas producidas por Bt que deben su nombre al hecho de poseer una actividad citolítica *in vitro* contra varios tipos de células (Knowles y Ellar, 1987; Thomas y Ellar, 1983a). Una gran variedad de diferentes toxinas Cyt han sido encontradas en cepas con actividad tóxica contra mosquitos *in vivo*, y los genes de muchas de ellas han sido identificados y secuenciados, como Cyt1Aa1 de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, Cyt1Aa2 de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* cepa PG14 (Earp y Ellar, 1987; Waalwijk *et al.*, 1985), Cyt2Aa1 de *B. thuringiensis* subsp. *kyushuensis* (Koni *et al.*, 1993), que también ha sido encontrada en *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73-E10-2 y el gen que codifica para la toxina Cyt1C en *B. thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* (Yu *et al.*, 1991).

### 2.5.1. Estructura de las toxinas Cyt.

El primer intento para modelar la estructura tridimensional de las toxinas tipo Cyt fue 1988 con la toxina Cyt1Aa producida por Bti (Ward *et al.*, 1988). Este modelo capturó algunas características de la estructura, como abundancia de láminas  $\beta$  y dos ramilletes de  $\alpha$ -hélices antiparalelas, pero no pudo proveer de una descripción del arreglo tridimensional de los elementos de la estructura secundaria. No fue sino hasta 1996, que Li y colaboradores lograron determinar la estructura en rayos X de la toxina Cyt2Aa1, antes

nombrada CytB (Figura 11), la cual consiste de dos horquillas  $\alpha$ -helicoidales externas (hélices A-B y C-D) flanqueando un núcleo de hojas  $\beta$  (láminas 1 a 7).



Posteriormente, con el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Cyt1Aa1 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*), Cyt1Aa3 (*B. thuringiensis* subsp. *morrisoni*), Cyt1Ab1 (*B. thuringiensis* subsp. *medellin*), Cyt1Ba1 (*B. thuringiensis* subsp. *neoleoensis*), Cyt2Ba1 (*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*) y Cyt2Aa1 (*B. thuringiensis* subsp. *kyushuensis*) (Butko, P. 2003), se observó la presencia de 4 bloques con alto grado de similitud y significancia estadística entre todas estas toxinas:

- 1) la hélice A (<sup>79</sup>YILQAIQLANAFQGGALDP<sup>96</sup>).
- 2) el asa después de la hélice D más la lámina  $\beta$ 4 (<sup>174</sup>TFTNLNTQKDEAWIFW<sup>189</sup>),
- 3) las láminas  $\beta$ 5 y 6 (<sup>212</sup>TNYYYNVLFAIQNEDTGGVMACVPIGFE<sup>239</sup>) y
- 4) la hoja  $\beta$ 6a y el asa subsiguiente hacia  $\alpha$ E (<sup>254</sup>LFFTIKDSARY<sup>264</sup>).

Ward *et al.*, en 1988, fueron los primeros en desarrollar mutagénesis sistemática de la toxina Cyt1Aa. Este grupo reemplazó residuos cargados (los cuales están usualmente expuestos sobre la superficie de las proteínas) por alanina, observándose que de 13 mutantes, sólo cinco (154, 163, 164, 213 y 225) tuvieron efectos importantes en cuanto a toxicidad y unión a lípidos. El hecho de que estas mutantes se encontraran en las asas entre

$\alpha$ D- $\beta$ 4,  $\beta$ 4- $\beta$ 5,  $\beta$ 6- $\alpha$ E y  $\alpha$ E- $\beta$ 7, sugiere que dichas regiones son de vital importancia en la actividad *in vivo* de Cyt.

### 2.5.2 Inhibición de toxicidad inducida por lípidos.

Thomas y Ellar mostraron que la preparación de las toxinas producidas por Bti pierden su actividad bajo incubación con lípidos (Thomas y Ellar, 1983b). Al mismo tiempo, demostraron que las determinantes importantes para la unión de toxina eran las cabezas polares de los lípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomielina) y la presencia de cadenas de ácidos grasos insaturados. Haider y Ellar, a su vez, en 1989, encontraron que la adición de toxinas de Bti a una suspensión de vesículas multilamelares causa un incremento inmediato en turbidez, el cual fue atribuido a la reorganización de los lípidos, los cuales incluyen vesicularización y agregación y/o fusión. Usando liposomas multilamelares (Drobniewski y Ellar, 1988; Haider y Ellar, 1989) y bicapas lipídicas (Knowles *et al.*, 1989) se ha demostrado que la acción citolítica de Cyt1Aa es mediada por la interacción toxina-lípido (Butko, 2003).

### 2.5.3. Canales selectivos a cationes, segmentos de toxina y modelo de formación de poro para las toxinas Cyt.

En 1989, Knowles *et al.*, reportaron que Cyt1Aa forma canales en bicapas lipídicas planas, pero solo a un pH de 9.5. Un análisis más exhaustivo de los canales de Cyt2Aa1 (*B. thuringiensis* var. *kyushuensis*) (Knowles *et al.*, 1992) probó inequívocamente la presencia de canales de potasio después de la incorporación de la toxina activada en bicapas lipídicas planas. Estos autores también observaron que la incorporación de la toxina induce la liberación total de glucosa en liposomas previamente cargadas con dicho azúcar.

Los resultados anteriores apoyan la idea del mecanismo de lisis coloide-osmótica de Cyt1A mediado por daño celular (Knowles y Ellar, 1987); es decir, que el proceso de equilibrio en las concentraciones de cationes a través de membrana resulta en un movimiento osmótico de agua con subsecuente hinchazón y eventual ruptura de la célula. Sin embargo, aunque estos resultados podrían ser un fuerte indicio de que la toxina Cyt1A se inserta en la membrana, se ha visto que las cuatro  $\alpha$ -hélices de Cyt1Aa1 que contienen



de 11 a 15 aminoácidos, son demasiado cortas para cruzarla (Butko *et al.*, 1997). De ahí que Li *et al.*, en 1996, sugiriera que las hojas  $\beta$  antes que las  $\alpha$ -hélices estarían implicadas en unión a membrana, inserción y formación del poro.

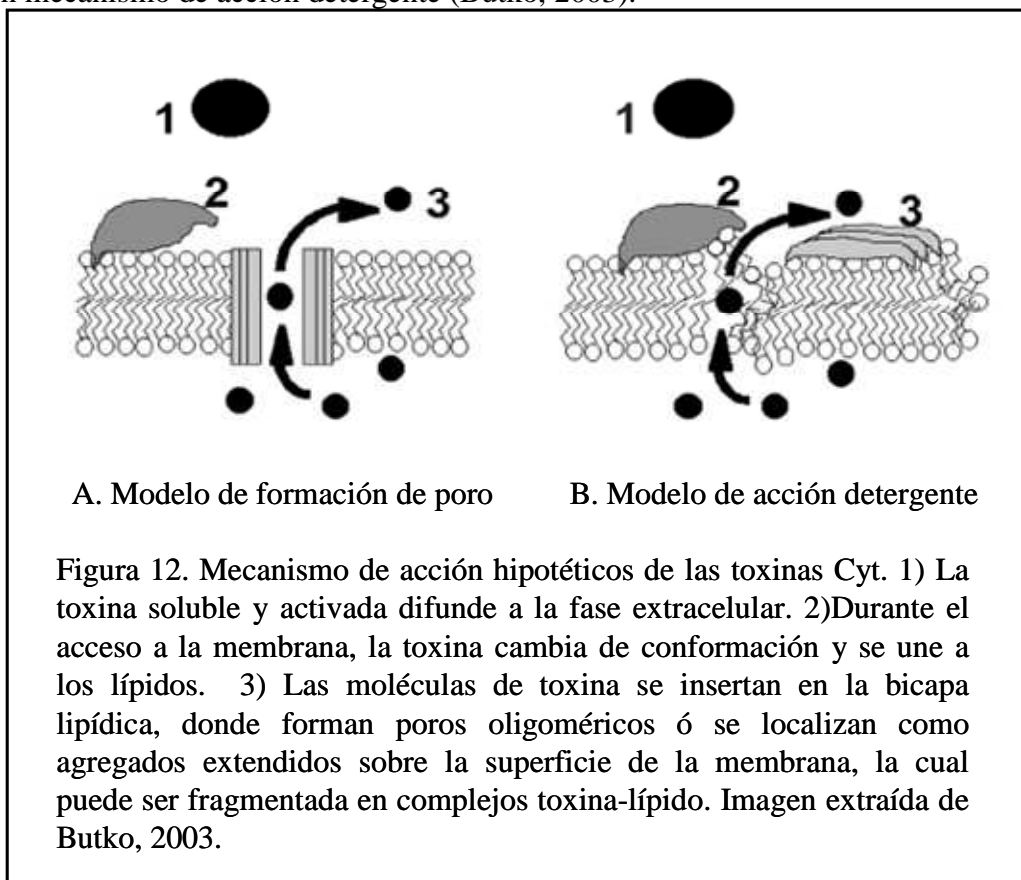
Un modelo hipotético propuesto para el poro formado por Cyt consiste de 6 moléculas de toxina ensambladas como una sombrilla abierta. El asa de la sombrilla comprende las cadenas  $\beta$ 5 a 7, atravesando la membrana lipídica, mientras que en la parte alta de la sombrilla se localizan las  $\alpha$ -hélices desplegadas sobre la superficie (Promdonkoy, 1999; Promdonkoy y Ellar, 2003). Por otro lado, la agregación de Cyt1A en la membrana parece jugar un papel importante en la hipótesis de formación de poro. Cuando el poro transmembranal es formado, a menudo diversas moléculas de toxina se ensamblan para crear la alineación del poro, como en la toxina de ántrax (Falnes y Sandvig, 2000). En 1997, Gazit y colaboradores, mostraron que las moléculas de Cyt1Aa pueden interactuar una con otra vía las hélices A y C, esto gracias a los resultados que observaron con péptidos sintéticos que mimetizaban dichas regiones y que fueron analizados por espectros de fluorescencia. No obstante, solo hay un reporte publicado sobre el aislamiento físico de agregados de Cyt1A por gradiente de sacarosa, en el cual, Chow y colaboradores, estudiaron la unión de Cyt1A marcada con  $^{125}\text{I}$  a eritrocitos y células de *A. albopictus* y *Choristoneura fumiferana* (Chow *et al.*, 1989). Una limitante de este estudio es que la composición de los agregados es incierta, debido al uso de las células completas, por lo que Cyt1A podría estar unida a un gran número de proteínas de membrana y no consigo misma. Como los canales o poros están usualmente formados por pequeñas subunidades proteicas ensambladas entre sí con una mayor o menor constante estequiométrica, la hipótesis del poro sólo podrá ser soportada encontrando oligómeros de bajo número de subunidades (Butko, 2003).

#### 2.5.4 Cyt1Aa como detergente.

La escasa información que se tiene para poder determinar la veracidad de los poros que forma la toxina Cyt1Aa *in vivo*, ha generado la idea de otro mecanismo de acción diferente al ya planteado. Dicho mecanismo podría estar basado en la posibilidad de que los agregados de Cyt1Aa puedan destruir completamente la membrana en la forma que lo haría

un detergente (Butko, 2003). Esta observación está sustentada por el trabajo de Butko y colaboradores, en el cual se observó que Cyt1A opera por un mecanismo de todo o nada, es decir, las células o vesículas después de estar en contacto con la toxina están ó intactas ó completamente rotas; no se encontraron vesículas que solo tuvieran pérdida parcial de su contenido. Lo que es más importante, la acción de detergente no requiere ni ensamblaje estequiométrico de la toxina ni penetración estable de ella a través de la bicapa lipídica, por lo que podría ser más factible que Cyt1A actuase de este modo.

Sea cual sea el mecanismo de lisis celular de la toxina Cyt1A, es importante mencionar que el modelo de formación de poro (Figura 12A) y de detergente (Figura 12B) no son mutuamente excluyentes. Cada uno puede operar a diferentes concentraciones de toxina o sobre diferentes escalas de tiempo. Mientras a bajas concentraciones la toxina puede formar poros a través de la inserción de estructuras de tipo oligomérico, a altas proporciones de concentración toxina/lípido, la membrana puede no ser capaz de acomodar el gran número de moléculas de toxina asociadas y, por lo tanto, romperse completamente por un mecanismo de acción detergente (Butko, 2003).



## **2.6 Subespecies de Bt con actividad mosquitocida.**

Por 40 años, los ensayos serológicos han sido ocupados como un sistema de clasificación para Bt. Estas pruebas se basan en la determinación del antígeno flagelar descrito por de Barjac y Bonnefoi en 1962. Las reacciones de aglutinación que se observan con el antígeno flagelar H son un fuerte indicio de la enorme diversidad genética entre las diferentes subespecies de Bt que han sido aisladas. Gracias a ello se ha establecido una clasificación de subespecies de *B. thuringiensis* que producen inclusiones tóxicas hacia dípteros, como *israelensis* (Goldberg *et al.*, 1977), *morrisoni* (Padua *et al.*, 1984), *fukuokaensis* (Yu *et al.*, 1991), *darmstadiensis* (Padua *et al.*, 1980) y *kyushuensis* (Ohba *et al.*, 1979). Recientemente se han identificado otras cepas de Bt con actividad mosquitocida (Ragni *et al.*, 1996). De entre estas, *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* y *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* son las más prometedoras, pues ambas producen proteínas de alta actividad contra mosquitos como: Cry11Ba1 y Cry11Bb1.

## **2.7 *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis*.**

La primera subespecie de Bt identificada con actividad contra larvas de mosquito fue *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* (Bti), que además es la que produce las inclusiones cristalinas más tóxicas (Figura 3). Esta bacteria fue descubierta en Israel por Goldberg y Margalit en el año de 1977. Bti ha mostrado ser tóxica contra dípteros del suborden Nematocera, incluyendo mosquitos de las familias Culicidae, Simuliidae, Tipulidae y Chironomidae, así como para insectos del género *Aedes sp* (agente vector de Dengue), *Culex sp* (vector de filariasis), *Mansonia sp*, *Anopheles sp* (vector de malaria) y *Simulium sp* (Federici BA., 1995). Las inclusiones cristalinas que produce Bti son principalmente seis: Cry4Aa1, Cry4Ba1, Cry11Aa1, Cry10Aa, Cyt1Aa1 y Cyt2Ba (Berry *et al.*, 2002). Bti alberga plásmidos que abarcan rangos de tamaño de entre 3 a 135 MDa (González *et al.*, 1984). Uno de estos plásmidos, con tamaño de 75 MDa, es el responsable de la actividad tóxica contra larvas de mosquitos, ya que contiene los genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry11Aa* y *cyt1Aa*, que codifican para proteínas de aproximadamente 134, 128, 70 y 27 kDa, respectivamente (de Barjac *et al.*, 1990; Delécluse *et al.*, 1991; Porter *et al.*,

1993). En este plásmido también se encuentra mapeado el gen regulatorio que codifica para un polipéptido de 20 kDa (proteína *helper*), el cual se requiere para la producción eficiente de las proteínas. (Adams *et al.*, 1989; Höfte *et al.*, 1989).

Bti se ha ocupado con gran éxito en programas operacionales de control de vectores. Bioinsecticidas comerciales realizados a base de los cristales paraesporales producidos por esta bacteria han sido exitosamente aplicados en campo como agentes de control biológico de mosquitos y moscas en diversas regiones del mundo, y Bti ha probado ser una alternativa práctica al control químico (Kurtak *et al.*, 1989). Parte de la aceptación que tiene el uso de Bti como insecticida biológico es su alta y específica actividad larvicida contra insectos del orden Diptera. Dicha especificidad tóxica es sumamente importante, pues no conlleva ningún tipo de efecto adverso sobre otros organismos en el ambiente (Georghiou *et al.*, 1997), incluyendo seres humanos. No obstante, el uso de Bti a nivel mundial es aún limitado, debido a la baja eficacia que algunas de las preparaciones comerciales han mostrado. Las principales razones de lo anterior son:

- 1) hundimiento de la muestra en el fondo del agua (Rashed *et al.*, 1989).
- 2) absorción de la muestra en materia orgánica (Margalit *et al.*, 1984; Ohana *et al.*, 1987).
- 3) consumo de la muestra por otros organismos para los cuales no es tóxica (Blaustein *et al.*, 1991).
- 4) inactivación por radiación solar (Cohen S., 1991; Pusztai *et al.*, 1991).

Una manera de superar las anteriores limitantes es clonar los genes que codifican para la toxinas de Bti (a partir de la tecnología de DNA recombinante) en organismos capaces de habitar ambientes acuáticos propios para el crecimiento de las larvas de mosquitos y que además puedan servir como fuente de alimentación para las mismas, como lo hicieron Wu y colaboradores en 1997 con *Anabaena*, ó realizando análisis exhaustivos sobre formulaciones adecuadas para el control biológico, como los que generaron la creación de VectoBac y Tecknar, preparaciones efectivas en costo y almacenamiento, fabricados por Valent Bio-Sciences y Certis respectivamente, y de amplio uso en Estados

Unidos por su resistencia a la luz UV, su estabilidad en agua y nula precipitación (Federici, 1995).

## **2.8 Sinergismo entre toxinas Cry y Cyt de Bti.**

Wu y Chang, en 1994, fueron los primeros en observar que cuando las proteínas del cristal de Bti eran mezcladas y probadas contra larvas de *A. aegypti*, la actividad de algunas de estas combinaciones era mayor que lo que se esperaría de la suma de actividad de las proteínas individuales. Lo que estos investigadores hicieron fue expresar diversas combinaciones de los genes de las toxinas de Bti en la cepa acristalífera 4Q7, con el fin de expresar por separado las diferentes proteínas Cry y Cyt. Sus conclusiones muestran que la presencia simultánea de Cyt1Aa y Cry11Aa resulta en una toxicidad de cuatro a cinco veces más alta que la de las proteínas solas. Este es un dato importante que soporta la idea de un proceso sinérgico entre Cyt1Aa y Cry11Aa (Wu y Chang, 1985; Ptitsyn *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1994).

Otros reportes (Angsuthanasombat *et al.*, 1992; Chilcott *et al.*, 1998; Crickmore *et al.*, 1995; Delécluse *et al.*, 1993; Poncet *et al.*, 1995) confirmaron interacciones sinérgicas entre las toxinas de Bti. Sin embargo, evaluar estos estudios y establecer con precisión cuál es la contribución de cada proteína a la toxicidad global de la inclusión nativa resulta difícil. Parte del problema es la gran variación reportada en cuanto a las toxicidades obtenidas para las toxinas de forma individual, probablemente, debido a las diferencias en las condiciones experimentales en que se realizan los bioensayos. Algunos de los factores que también complican la observación son: diferencias en la especie de larvas usadas (aparentemente las toxinas no matan igual a un género de mosquito que a otro); tamaño, calidad y solubilidad de los cristales; variación en las condiciones del bioensayo, incluyendo tipo de dieta, temperatura, pH y salinidad; variación natural en las poblaciones de insectos (uso de insectos en diferentes fases de desarrollo); inactivación potencial (o, posiblemente, activación accidental por impurezas con proteasas) durante procedimientos de purificación por cromatografía; complejidad inmune en las especies de mosquitos; diferentes condiciones de cría de los insectos y diferencias en las formulaciones de Bti con

que se alimenta a las larvas (esporas intactas, cristales solubilizados, cristales reprecipitados, y/o esporas encapsuladas o cristales) (Schnepf *et al.*, 1998).

Un estudio de Crikmore y colaboradores en 1995, intentó resolver un poco los problemas anteriores estableciendo constantes experimentales de bioensayo. Fue así que usando larvas del 4º. estadio de *Ae. aegypti* a una temperatura de 25°C, se observó que la potencia en las actividades relativas de las toxinas de forma individual contra dicho insecto son, de la más a la menos activa: Cry11Aa, Cry4Ba, Cry4Aa y Cyt1Aa, esto tomando en cuenta los valores de dosis letal media LC<sub>50</sub> (Schnepf *et al.*, 1998). Al mismo tiempo se demostró la existencia de interacciones sinérgicas con todas las combinaciones posibles de toxinas, aunque el alcance de esta interacción fue dependiente de la combinación. Sin embargo, ninguna combinación fue tan activa como el cuerpo paraesporal completo de Bti. Una de las razones para explicar la observación anterior, es que quizás el cristal nativo de Bti se ingiriera mejor y se haga soluble más fácilmente en el intestino medio del insecto que los cristales provenientes de cepas recombinantes. Adicionalmente, la presencia de las cuatro toxinas en un solo cristal puede de alguna manera ser más eficiente que la mezcla de dichas toxinas en un bioensayo. (Schnepf *et al.*, 1998)

Una alternativa para estudiar las contribuciones relativas de las toxinas de Bti fue construir cepas en las cuales el gen de *cry11Aa* ó el de *cyt1Aa* fueran genéticamente inactivados. El efecto de la inactivación de *cry11Aa* (Poncet *et al.*, 1995) redujo a la mitad la toxicidad de la proteína. En contraste, la inactivación del gen *cyt1Aa* (Delécluse *et al.*, 1991) produjo una cepa con toxicidad similar a la cepa nativa, sugiriendo que la toxina Cyt1Aa no es esencial para la actividad mosquitocida. Sin embargo, este dato debe interpretarse con precaución ya que recientemente se ha reportado que Bti también contiene genes que codifican para la proteína Cyt2Ba1, por lo que el efecto de la ausencia de la toxina Cyt1Aa puede verse compensado por la presencia de esta otra proteína Cyt.

Ben-dov y colaboradores, en 1995, también demostraron las interacciones sinérgicas, mediante la clonación de los genes que codifican para las proteínas Cry4Aa, Cry11Aa y la proteína *helper* de 20 kDa, en siete posibles combinaciones dentro de dos

vectores de expresión en *E. coli* (pUHE y pT7). Las cuatro combinaciones que contenían Cry4Aa mostraron altos niveles de actividad larvicida. La toxicidad mostrada por la combinación de Cry4Aa y Cry11Aa fue siete veces mayor de la que mostraba Cry4Aa sola, lo cual, muestra nuevamente un efecto sinérgico entre las toxinas de Bti.

Por otro lado, está demostrado que el mecanismo más frecuente por el cual los insectos generan resistencia a las toxinas Cry involucra un cambio en la unión a su receptor (Ferré y van Rie, 2002). No obstante, ni en campo, ni a nivel laboratorio, ha sido posible obtener líneas resistentes a larvas de mosquitos tratadas con Bti aun y cuando formulaciones hechas a partir de su cristal paraesporal han sido usados por más de 20 años a la fecha (Becker, 2000). Se piensa que la ausencia de dicha resistencia se debe principalmente a la presencia de la proteína Cyt1Aa en el cristal paraesporal (Georghiou and Wirth, 1997), ya que es posible obtener líneas resistentes del mosquito *Cx. quinquefasciatus* a las toxinas Cry de Bti (Cry4Aa, Cry4Ba y Cry11Aa) pero no a la toxina Cyt1Aa, además de que dicha resistencia sólo se obtiene cuando las larvas son expuestas a cualquiera de las toxinas Cry en ausencia total de Cyt (Wirth *et al.*, 1997). Por si esto fuera poco, también se ha comprobado que la toxina Cyt1Aa es capaz de suprimir la resistencia que presentan las larvas de *Cx. quinquefasciatus* a toxinas Cry (Wirth *et al.*, 1997), por lo que no es extraño pensar que exista un mecanismo de acción muy particular que relaciona a las toxinas tipo Cry con las tipo Cyt, generando como respuesta una potente capacidad para evitar la generación de resistencia en mosquitos.

No obstante lo anterior, aun no se ha reportado ningún trabajo experimental que explique el mecanismo de acción sinérgico entre las toxinas Cry y Cyt de Bti y mucho menos la nula generación de resistencia en mosquitos con el uso de estas toxinas. Es por ello que el presente trabajo de investigación se centró en realizar un análisis exhaustivo de la posible interacción entre dos de las proteínas más abundantes en el cristal paraesporal de Bti: Cry11Aa y Cyt1Aa, con el fin de poder establecer un mecanismo de acción general que explique las bases fundamentales de su sinergismo usando como modelo de estudio a larvas del mosquito *Ae. aegypti*.

### 3. HIPÓTESIS

Los bioinsecticidas elaborados a partir del uso del cristal paraesporal producido por Bti no han generado resistencia en campo pese a tener más de 20 años de ser usados de manera continua (Guerchicoff *et al.*, 1997). La pregunta más importante que surge al respecto es ¿por qué no hay reportes de mosquitos resistentes al cristal producido por Bti, pero sí los hay para otras toxinas con actividad mosquitocida como serían las toxinas Bin producidas por *B. sphaericus*? Hoy en día, sabemos que la nula resistencia que los mosquitos presentan ante Bti se debe específicamente a la presencia de la toxina Cyt1Aa en el cristal paraesporal (Wirth *et al.*, 1997 y 2005). Si consideramos que el mecanismo más frecuente por el cual los insectos generan resistencia a las toxinas Cry involucra mutaciones en el receptor en el intestino (Ferré and van Rie, 2002), y sabemos que Cyt1Aa es capaz de sobrepasar la resistencia de los mosquitos a Cry4Aa, Cry4Ba y Cry11Aa, podemos pensar que entre las toxinas tipo Cry y Cyt existe un mecanismo especial de interacción toxina-receptor, que bien podría estar vinculado con el evento de sinergismo que estas proteínas muestran en su toxicidad.

Esta idea no es descabellada. Se sabe que las toxinas Cry se unen a receptores de tipo proteico ubicados en la microvellosidad apical del intestino medio del insecto, induciendo oligomerización de la toxina y la subsecuente inserción en membrana formando poros iónicos que causan lisis celular (Li *et al.*, 1996). En contraste, las toxinas Cyt no se unen a receptores proteínicos, sino que interactúan directamente con lípidos de membrana para inducir la formación de poro (Promdonkoy *et al.*, 2000). Lo anterior explicaría el por qué no ha sido posible la generación de líneas resistentes de mosquitos a la toxina Cyt1Aa, pues su posible receptor no sería de tipo proteico, sino más bien lipídico y componente abundante en la estructura y la estabilidad de la membrana. Por lo tanto, cualquier tipo de cambio que pudiera sufrir dicho lípido con el fin de evitar la inserción de Cyt en membrana, involucraría un alto costo energético con el que evolutivamente los mosquitos no podrían contender. Además, no es extraño pensar que un lípido funcione como un receptor para toxinas bacterianas. En toxinas tipo Cry5 se ha reportado que los glicosfingolípidos son los receptores determinantes para la acción tóxica en *Caenorhabditis elegans* (Griffitts *et al.*, 2005). Por ello, pensar



que este mismo tipo de evento se suceda en los intestinos de larvas de mosquitos con Cyt1Aa, resulta factible.

Además de lo anterior, es importante recalcar que la toxina Cyt1Aa de manera individual, es en promedio un orden de magnitud menos tóxica para larvas de mosquitos en comparación con las toxinas tipo Cry4 o Cry11Aa (Promdonkoy *et al.*, 2005). Esto evidenciaría el hecho de que individualmente la toxina Cyt1Aa no tiene una actividad altamente mosquitocida a concentraciones fisiológicamente relevantes (nm ó pm), pero en combinación con Cry11Aa ó Cry4, incrementa su actividad tóxica debido a que Cyt funcionaría como un receptor extra en el caso de mosquitos sensibles a toxinas Cry ó como el receptor necesario para recuperar la mortalidad en mosquitos resistentes a estas mismas toxinas.

Si analizamos que pasa con otras toxinas bacterianas en su mecanismo de patogénesis, encontraremos ejemplos interesantes en los cuales se puede observar que es factible que un microorganismo lleve consigo el agente patógeno y la maquinaria necesaria para que dicho agente pueda ejercer su acción sobre la célula blanco. Por ejemplo, *B. anthracis*, es una bacteria que produce una toxina compuesta por tres componentes principales: el antígeno protector (PA), el factor edema (EF) y el factor letal (LF) (Petosa *et al.*, 1997). El sitio blanco de EF y LF es el citoplasma de la célula, pero para llegar a él, necesitan forzosamente de la presencia de PA, pues este componente es el encargado de unirse a la superficie celular a través de receptores de membrana y posteriormente translocar a los componentes enzimáticos del exterior de la célula al citoplasma (Abrami *et al.*, 2000b). Esto quiere decir que sin la presencia de PA como parte de la maquinaria de patogénesis, EF y LF son completamente inocuos para la célula por su incapacidad de llegar a su sitio blanco, lo que implicaría una cierta dependencia de los tres factores para llevar a cabo el mecanismo tóxico de *B. anthracis*. Por otro lado, la bacteria *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), es capaz de inyectar al receptor TIR dentro de las células hospederas para así ejercer su acción tóxica (Kenny *et al.*, 1997). Sin el receptor TIR, EPEC pierde su capacidad invasiva, por lo que resulta sumamente importante que lo lleve consigo para ejercer su mecanismo de acción general. Por todo lo anterior, podemos decir que en el caso de bacterias cuya patogénesis recae en la generación de toxinas, el microorganismo puede desarrollar una

nueva estrategia de infección que consiste en producir múltiples proteínas, de las cuales, una puede ejercer el rol de receptor para que el resto ejerzan su acción final, y este bien podría ser el caso de las toxinas producidas por Bti.

Aunado a lo anterior y si pensamos que realmente Cyt1Aa puede funcionar como un receptor para las toxinas Cry de Bti, la pregunta sería, ¿qué tipo de receptor podría ser y cuál sería su verdadero rol en el mecanismo de acción de las toxinas Cry? Sabemos que para toxinas tipo Cry1A existen al menos dos receptores de vital importancia en el mecanismo de acción: 1) caderina, que produce el corte de la hélice  $\alpha 1$  y la formación de una estructura de pre-poro u oligómero y 2) APN, que facilita la inserción del oligómero en zonas de membrana tipo “rafts” lo que permite la formación de un poro iónico. En el caso de las toxinas Cry de Bti, hasta el momento sólo se ha reportado a una proteína tipo ALP como receptor de la toxina Cry11Aa (Fernández *et al.*, 2006). Esta proteína, al igual que la APN de *M. sexta*, se encuentra anclada a membrana por un grupo GPI, por lo que se deduce que su acción estaría vinculada con el proceso de inserción del pre-poro ya formado de Cry11Aa. Se propone que también existe una proteína tipo caderina que puede funcionar como el receptor encargado de inducir el proceso de oligomerización en Cry11Aa, pero eso no ha sido demostrado. De hecho no se sabe si Cry11Aa es capaz de formar una estructura de pre-poro, ni si la toxina Cyt1Aa pudiera estar involucrada en este proceso.

Dado que el mecanismo de sinergismo existente entre las toxinas tipo Cyt y Cry de Bti sigue siendo desconocido, el siguiente trabajo de investigación tratará de entender las bases moleculares que involucran este incremento de actividad.

La hipótesis que sustenta el proyecto tiene dos vertientes y se enuncia a continuación:

1. El efecto sinérgico entre las toxinas Cry11Aa y Cyt1Aa, se debe a interacciones intermoleculares específicas entre éstas proteínas. La toxina Cyt tiene una gran afinidad por la membrana de insectos dípteros como mosquitos, por lo que al unirse a ella, expone regiones específicas que son reconocidas por Cry11Aa, facilitando así, la inserción de dicha toxina en membrana.

2. La toxina Cyt1Aa, en su función de receptor, es capaz de favorecer la formación de un oligómero funcional de Cry11Aa, tanto en vesículas de membrana de la microvellosidad apical del intestino medio de larvas de *Ae. aegypti*, como en liposomas sintéticos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivos generales.

1) Analizar la interacción proteína-proteína de las  $\delta$ -endotoxinas Cry11Aa y Cyt1Aa con el fin de estudiar las bases moleculares del sinergismo.

2) Determinar la participación de la toxina Cyt1Aa en la oligomerización de Cry11Aa en presencia de vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA) del intestino de *Ae. aegypti* y liposomas sintéticos.

### 4.2 Objetivos específicos.

1) Analizar la interacción de Cry11Aa con Cyt1Aa por medio de ensayos de unión secuencial, inmunoprecipitación, ligand blot y ELISA.

2) Identificar las regiones mínimas de interacción entre Cry11Aa y Cyt1Aa por el sistema de dos híbridos en levadura y mediante el uso de péptidos inmovilizados en membrana de nitrocelulosa por síntesis SPOT.

Con la región mínima identificada:

3) Realizar competencias homólogas y heterólogas en ensayos de unión en suspensión y unión a ligando, usando péptidos sintéticos que mimeticen la región o regiones mínimas obtenidas, con el fin de observar cambios en interacción entre Cry11Aa y Cyt1Aa.

4) Mutagenizar a la toxina Cyt1Aa y la toxina Cry11Aa en la región mínima de interacción para observar posibles efectos en su interacción y toxicidad.

5) Determinar el factor de sinergismo y la  $K_d$  aparente de las diversas combinaciones de proteínas Cry11Aa y Cyt1Aa (silvestres y mutantes), con el fin de establecer una correlación entre la disminución de afinidad y la pérdida de sinergismo.

6) Estandarizar las condiciones idóneas de formación de oligómero de Cry11Aa en presencia y ausencia de Cyt1Aa.

7) Probar la actividad del oligómero de Cry11Aa en ensayos de permeabilización a membrana del ion  $K^+$  y liberación de calceína utilizando liposomas sintéticos.

8) Analizar el efecto de las mutantes de Cyt1Aa en el proceso de oligomerización de Cry11Aa silvestre, con el fin de establecer una posible relación entre el proceso de sinergismo y la formación de una estructura de pre-poro.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Cepas.

Las cepas utilizadas para la realización de este trabajo fueron:

- *Bacillus thuringiensis* CG6, que contiene el plásmido pWF26 (resistente a eritromicina) que expresa la proteína Cry11Aa.
- *Bacillus thuringiensis* 4Q7 que contiene el plásmido pWF45 (resistente a eritromicina) que expresa la proteína Cyt1Aa.
- *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* HD916, provista por el *Bacillus* Genetic Stock Center (Columbus OH).
- *Saccaromyces cerevisiae* L40. Genotipo: MATa *his3Δ200 trp1-90l leu2-3112 ade2 LYS2::(4lexAop-HIS3)URA3::(8lexAop-lacZ)GAL4*. Fenotipo: His<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>, Ade<sup>-</sup>. Fuente: Kit Hybrid Hunter, Invitrogen.
- *Escherichia coli* XL-10 gold. Genotipo: EndA<sup>-</sup>, LacI<sup>q</sup>, episoma F', Rec A<sup>-</sup>. Fuente: Stratagene.

### 5.2 Selección de antibiótico.

Las concentraciones estándar de antibióticos que se usaron a lo largo de este trabajo se presentan en la siguiente tabla. Dichas concentraciones se usaron tanto en medio líquido como en sólido.

Antibiótico	Stock	Concentración final
Ampicilina	100 mg/ml	100 µg/ml
Eritromicina	10 mg/ml	25 µg/ml (Bt CG6) 10 µg/ml (Bt 4Q7)
Zeocina	100 mg/ml	100 µg/ml ( <i>E. coli</i> XL-10 Gold) 300 µg/ml ( <i>S. cerevisiae</i> L40)

Tabla 1. Concentraciones de antibiótico usado en medios de cultivo

### 5.3 Purificación y procesamiento de las proteínas Cry11Aa y Cyt1Aa.

La cepa de Bt CG6, clonada con el plásmido pWF26 que expresa la proteína Cry11Aa, y la cepa de Bt 4Q7 con el plásmido pWF45 que expresan la proteína Cyt1Aa, se colocaron en medio mínimo líquido SP (con su respectiva concentración de eritromicina) para favorecer su esporulación y producción de inclusiones cristalinas.

Una vez que el medio se encontró 100% esporulado (chequeo por microscopio), se recuperó el cultivo centrifugando a 10000 rpm por 10 minutos (centrífuga Beckman J2-HS, rotor JA-20), eliminando el sobrenadante. Se resuspendió y lavó la pastilla en una solución de 0.3 M de NaCl y 0.01 M de EDTA pH 8.0. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante y se sometió al pellet al mismo proceso anterior por 2 veces más. Se resuspendió y lavó la pastilla en una solución de PMSF 1 mM. Se centrifugó 10 min a 10000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se volvió a resuspender el pellet en buffer TTN (Tris 20 mM, tritón x-100 0.1%, NaCl 300 mM, pH 7.2 ajustado con HCl) y se sonicó dando tres pulsos de 60" a 20 watts x 1' de descanso para luego someter a la suspensión a un gradiente de sacarosa utilizando las siguientes concentraciones: 84%, 79%, 72% y 67% (Thomas y Ellar, 1983b). Cada una de las concentraciones de azúcar llevan adicionalmente los siguientes reactivos: 400 µl de tritón 1%, 2 ml Tris-HCl 1 M pH 8.0 y 80 µl de NaCl 5 M. Se centrifugó a 23000 rpm, 20' a 15°C (ultracentrífuga Beckman L-80, rotor SW28) y luego se recuperó la fracción donde se encuentran los cristales (que para ambas proteínas es entre 79 y 72%) y se eliminó la sacarosa lavando tres veces con tritón x-100 al 0.01% y centrifugando a 10000 rpm por 10 min. Finalmente se resuspendió la pastilla en una solución de PMSF 1 mM y Tris 50 mM pH 8.0 y se guardó la muestra de cristales a 4°C para su conservación.

Los cristales de Cyt1Aa se solubilizaron en buffer carbonatos 0.05 M pH 10.5 (stock de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.5 M y NaHCO<sub>3</sub> 0.5 M) en presencia de 10 mM de DTT a 37°C por 1 h. El sobrenadante se recuperó centrifugando a 14000 rpm por 10' (centrífuga Eppendorf 5415 C) para recuperar a la forma soluble de la toxina o protoxina. Posteriormente se llevó a cabo la activación de la protoxina con proteinasa K (SIGMA) en una proporción enzima/protoxina de 1:30, a 30°C por 1 h.

Por su parte, los cristales de Cry11A se solubilizaron en una solución de 100 mM NaOH a 4°C por 1 h. Se recuperó el sobrenadante centrifugando a 14000 rpm por 10' (centrífuga Eppendorf 5415 C) y se le ajustó el pH a 10.5 con HCl 5M. Posteriormente se activaron los cristales con tripsina (SIGMA) en una proporción enzima/protoxina de 1:50, a 25°C por 2 h. En el caso de los ensayos de oligomerización, una vez que la protoxina de Cry11Aa tuvo el pH ideal de 10.5, se dializó contra buffer carbonatos 0.05 M pH 10.5.

#### **5.4 Purificación de vesículas de membrana de microvellosidad apical (VMMA).**

Las VMMA provenientes de intestinos disectados de larvas del 4º. estadio de *A. aegypti* fueron preparadas por centrifugación diferencial (Nielsen-LeRoux y Charles, 1992). Se realizó la disección de aproximadamente 1000 larvas por preparación. Los intestinos obtenidos se homogenizaron en presencia de buffer MET (300 mM de manitol/ 5 mM de EGTA / 200 mM de Tris-HCl pH 7.4 ) y MgCl<sub>2</sub> 24 mM. Se agitó, se dejó en hielo por 20' y posteriormente se centrifugó a 3000x g, recuperando el sobrenadante. Este proceso se repitió una vez más, solo que una velocidad de 2000x g. Los sobrenadantes de ambas centrifugaciones, se juntaron y sometieron a un nuevo proceso de centrifugación por 10' a 100000x g (Ultracentrífuga Optima™ Beckman, rotor MLA 130). Se desechó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 100 µl de buffer MET. Las VMMA se guardaron a -70°C, no sin antes verificar su patrón de proteínas por medio de un gel de SDS-PAGE al 10% (Houk *et al.*, 1986).

#### **5.5 Determinación de concentración de proteína total.**

La determinación de la concentración de proteína total de VMMA y proteínas varias se realizó por método de Bradford. En un volumen de 790 µl de agua, se agregaron 10 µl de la muestra a medir. Se agitó perfectamente bien y luego se adicionaron 200 µl de reactivo de Bradford (Bio-Rad). Se tomó la lectura de absorbancia a  $\lambda$  de 595 nm ocupando un espectrofotómetro (Pharmacia LKB Ultraspec II) y los valores se interpolan a una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de concentraciones de 1 a 20 µg/ml.



## 5.6 Bioensayos con larvas de *Ae. aegypti*.

Los bioensayos se realizaron con larvas de 4o. estadio de *Ae. aegypti* utilizando esporas/cristales de Cry11Aa y Cyt1Aa. Los ensayos fueron desarrollados en un volumen de aproximadamente 100 ml de agua desclorada, donde se colocaron 10 larvas de *Ae. aegypti* por dosis. Por método de Bradford se determinó la concentración total de proteína de las diferentes muestras de esporas/cristales y con este dato se calculó la dosis requerida de la siguiente manera:

Concentración de esporas cristales de HD916: 1.72  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Dosis a aplicar: 10 ng/ml.

Cantidad de nanogramos que se requieren para obtener una dosis de 10 ng/ml en 100 ml de agua desclorada:

10 ng ----- 1 ml

$\chi$  ng ----- 100 ml = 1000 ng ó **1  $\mu\text{g}$ .**

Cantidad de esporas/cristales a agregar a partir de un stock de esporas/cristales HD916 a una concentración de 1.72  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ :

1.72  $\mu\text{g}$  ----- 1  $\mu\text{l}$

**1  $\mu\text{g}$**  -----  $\chi$   $\mu\text{l}$  = **0.58  $\mu\text{l}$ .**

Por lo tanto, de un tubo de esporas/cristales de HD916 con una concentración de 1.72  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , se tomaron **0.58  $\mu\text{l}$  o 58  $\mu\text{l}$  de una dilución 1:100** del concentrado (stock HD916:agua), y se agregaron al volumen final de 100 ml de agua desclorada, que contenía las diez larvas de mosquitos. La mortalidad presentada en el bioensayo se analizó después de 24 h de agregar la proteína. Como control positivo se utilizó la cepa de Bti (HD916) en una dosis de 25 ng/ml, mientras que como control negativo se ocupó únicamente agua desclorada. Los datos de mortalidad fueron analizados por la prueba Probit donde se relaciona el logaritmo de la dosis aplicada contra el porcentaje de mortalidad (Finney, 1971). Las  $\text{LC}_{50}$  se obtuvieron utilizando el programa de análisis

estadístico Polo-PC de LeOra Software, Berkeley CA. Para mayor información acerca del análisis Probit revisar la sección de Apéndice VII (página 159).

### 5.7 Determinación del factor de sinergismo.

Los bioensayos para determinar el factor de sinergismo de las diferentes combinaciones de proteínas se realizaron ocupando 20 larvas del 4o. estadio de *Ae. aegypti* en 100 ml de agua desclorada. Diferentes proporciones de las proteínas Cyt1Aa:Cry11Aa silvestres y mutantes (1:1, 0.5:1 y 0.2:1) fueron ensayados. Como control positivo se ocupó el cristal paraesporal completo de Bti y como control negativo agua desclorada. El efecto de mortalidad de las toxinas ocupadas en forma individual y en mezclas se verificó 24 h más tarde de colocar la toxina. La dosis letal media (LC<sub>50</sub>) fue estimada por análisis PROBIT ocupando los resultados obtenidos después de cuatro ensayos independientes.

Por su parte, la dosis letal teórica de cada mezcla de toxinas se obtiene asumiendo un efecto aditivo entre sus componentes (Tabashnik, 1992). Por lo tanto, el valor de la LC<sub>50</sub> teórica correspondería a los valores intrínsecos de LC<sub>50</sub> que cada componente proporcione individualmente, lo cual, se observa en la siguiente ecuación:

$$LC_{50 \text{ teórica}} (\text{Cyt1Aa}+\text{Cry11Aa}) = \left[ \frac{r_{\text{Cyt1Aa}}}{LC_{50} (\text{Cyt1Aa})} + \frac{r_{\text{Cry11Aa}}}{LC_{50}(\text{Cry11Aa})} \right]^{-1}$$

donde  $r_{\text{Cyt1A}}$  y  $r_{\text{Cry11A}}$  son las proporciones de Cyt1Aa y Cry11Aa usadas para cada mezcla y la  $LC_{50}(\text{Cyt1Aa})$  y  $LC_{50}(\text{Cry11Aa})$  son las dosis obtenidas, por bioensayos, para cada toxina de forma individual y mostradas en la tabla 4.

Por ultimo, el factor de sinergismo (FS) fue calculado dividiendo la toxicidad teórica entre la toxicidad observada en el bioensayo. Valores de  $FS > 1$  indican sinergismo (Tabashnik, 1992).

### **5.8 Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).**

Para analizar el patrón de bandeo de las proteínas solubilizadas, activadas, en unión con VMMA y en ensayos de oligomerización, se usaron geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10, 12 y 15% con un gel stacking al 5% como se describe por Laemmli *et al.*, 1970. El gel se tiñó con colorante Coomassie (Bio-Rad). Los marcadores de peso molecular Bio-Rad fueron utilizados como estándares.

### **5.9 Biotinilación de proteínas.**

Se empacó una columna con 1 g de sephadex G25 ó G50 (SIGMA) y se resuspendió en 4-6 ml de PBS 1x preparado según Maniatis *et al.*, 1992. Se lavó la columna con al menos 15 ml de buffer PBS 1x para equilibrarla. Posteriormente, se colocó la columna en un tubo de ensayo de vidrio y éste dentro de un tubo Falcon de 15 ml. Se centrifugó la columna a 2000x g por 2' para eliminar el excedente de buffer PBS.

Por su parte, la proteína previamente dializada en buffer de boratos (ácido bórico 0.05M; NaOH 0.05M; NaCl 0.15 M pH 8.6 ajustado con HCl) se incubó con un éster de biotina (Amersham) por 45' a TA (por cada 0.6 mg/ml de proteína a marcar, se agregaron 20 µl de reactivo de biotinilación). La muestra incubada con biotina se colocó en la columna de sephadex y se centrifugó a 2000 rpm por 2' para recuperar la muestra biotinilada. La concentración de proteína total obtenida después del marcaje se determinó por método de Bradford. Se corrió un gel de SDS page al 15% con 2 µl de la muestra marcada, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa ECL (Amersham) utilizando cámara húmeda por 45' a 350 mA (buffer de transferencia: stock sin SDS 10x, metanol al 20%) y se incubó con estreptavidina acoplada a peroxidasa (SAPO) para posteriormente detectar la señal dada por la toxina utilizando reactivos quimioluminiscentes (Pierce).

### **5.10 Análisis de unión secuencial sobre VMMA de *Ae. aegypti*.**

Este ensayo está basado en el de Bosch y colaboradores. Primeramente se descongelaron las VMMA de *Ae. aegypti* y se tomaron 10 µg de las mismas para preincubarlas con 5 nM de Cyt1Aa en un volumen de 100 µl de buffer de unión (PBS

1x, BSA 0.1% y tween 20 0.1%, pH 7.6). Posteriormente se realizaron tres lavados por centrifugación ( $10^4$  a  $14,000 \times g$ ) y el pellet se recuperó para analizar la unión de 5 nM de Cry11Aa biotinilada. La toxina Cry11Aa marcada que no se unió a la membrana fue removida nuevamente por centrifugación. El pellet se sometió a un gel de SDS-PAGE al 15% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa ECL (Amersham) por 45' a 350 mA en cámara húmeda. La toxina biotinilada que permaneció unida a las vesículas se visualizó por incubación con estreptavidina acoplada a peroxidasa y se reveló con reactivos quimioluminiscentes (Pierce). Membranas control (sin la presencia de Cyt1Aa) fueron ocupadas para realizar el mismo experimento y determinar el efecto de Cyt1Aa sobre la unión de la toxina Cry11Aa marcada a VMMA.

### **5.11 Ensayo de unión a ligando (ligand blot).**

2  $\mu$ g de las toxinas Cry11Aa y Cyt1Aa fueron sometidas a un gel de SDS-PAGE al 10% y transferidas a una membrana de PVDF Immobilon-P (Milipore) por 45' a 350 mA en cámara húmeda. Se renaturalizó la membrana por 15' en PBS 1x para posteriormente bloquearse 1 h con BSA 1% en PBS 1x, tween 20 0.1%. Se enjuagó dos veces con buffer de lavado (PBS 1x, tween 20 0.1%), para posteriormente incubarse por 2 h con la toxina en buffer de incubación (PBS 1x, 0.2% BSA, 0.1% tween 20). Se enjuagó nuevamente con buffer de lavado y se incubó con SAPO en concentración 1:6000 por 1 h. Se enjuagó exhaustivamente con agua MQ, buffer de lavado y PBS 1X, para finalmente revelar la señal obtenida con reactivos quimioluminiscentes (Pierce).

### **5.12 Western Blot.**

Las muestras de proteínas obtenidas del ensayo de oligomerización fueron hervidas por 5 min en presencia de buffer Laemmli, separadas por gel SDS-PAGE al 10% y electrotransferidas a una membrana de PVDF Immobilon-P (Milipore) por 2 h a 350 mA en cámara húmeda. Posteriormente, la membrana fue bloqueada con leche al 5% en PBS 1x y tween 20 al 0.05%. La presencia de las proteínas Cry11Aa o Cyt1Aa fueron detectadas utilizando anticuerpos policlonales anti-Cry11Aa (1:15000) ó anti-Cyt1Aa (1/25000) por 2 h, seguido por una incubación con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (1:10000) por 1 h. Finalmente, la señal obtenida se reveló con reactivos quimioluminiscentes (Pierce).

### **5.13 ELISA.**

Placas de ELISA de 96 pozos fueron incubados por 12 h a 4°C con 5 µg/ml de Cyt1Aa en buffer de fijación de proteínas (50 mM NaHCO<sub>3</sub> pH 9.6). Posteriormente se lavó cinco veces con 300 µl de buffer de lavado (PBS Tween 20 0.1%) y se bloqueó cada pozo con 300 µl de gelatina 0.5% en buffer de lavado por 1 hora a 37°C. Posteriormente se lavó nuevamente y se incubó con diferentes concentraciones de Cry11Aa (0.25-2 µg/ml) por 2 h a 37°C. La toxina Cry11Aa unida a Cyt1Aa que permaneció aún después de los lavados, se detectó con un anticuerpo anti-Cry11Aa (1:1000) por 2 h a 37°C, seguido de un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa por 1 h a 37°C. La actividad enzimática se reveló con el sustrato *o*-fenilenediamina en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y buffer fosfato/citrato pH 5.0. La reacción se detuvo con 6 N HCl y se determinó la absorbancia a 490 nm.

### **5.14 Ensayos de inmunoprecipitación.**

El anticuerpo anti-Cry11Aa fue acoplado a perlas de proteína A-sefarosa por medio de una incubación de 1 h a 25°C. Al mismo tiempo, 10 µg de la toxina Cry11Aa fueron incubados por 1 h a 25°C en presencia o ausencia de 10 µg Cyt1Aa. Posteriormente 100 µl de las perlas suspendidas con el anticuerpo fueron incubados por 12 h a 4°C con la mezcla de proteínas Cyt y Cry. Alternativamente, 50 µg de VMMA fueron incubados por 1 h con 10 µg Cyt1Aa a 25°C. Las membranas se centrifugaron 10 min a 14,000 x g, se lavaron y se resuspendieron en PBS 1x. 10 µg de toxina Cry11Aa fue incubada entonces con las VMMA 1h a 25°C. Las VMMA fueron lavadas con PBS 1x y los pellets solubilizados por 1 h a 25°C en 100 µl de PBS, 1 mM PMSF, 40 mM CHAPS y 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Las muestras fueron centrifugadas 10 min a 14,000 x g y el sobrenadante que contenía a las membranas solubilizadas fue incubado 12 h a 4°C con 100 µl de perlas previamente inmersas en anticuerpo anti-Cry11Aa de la misma forma en que lo hicieron las proteínas solubles. Ambas muestras fueron sometidas a centrifugación (10 min a 14,000 x g), lavadas seis veces con PBS 1x y posteriormente hervidas con buffer Laemmli, para posteriormente ser separadas en un gel de SDS-

PAGE al 12%. El resultado del ensayo fue visualizado por Western blot usando anticuerpos específicos.

### 5.15 Construcciones para el sistema de dos híbridos.

La secuencia completa de los genes de *cryIIAa* y *cytIIAa* así como los diferentes fragmentos de las proteínas fueron obtenidos por PCR usando oligonucleótidos específicos (tablas 2 y 3). Los productos de PCR del gen *cryIIAa* fueron digeridos con *SacI* y *PstI* (Biolabs) y clonados en el plásmido pHybLex/Zeo (Invitrogene). Los productos de PCR del gen *cytIIAa* fueron digeridos con *KpnI* y *SphI* (Biolabs) y clonados en el plásmido pYESTrp2 (Invitrogene).

Oligo	Posición*	Secuencia	Enzima de restricción
Cry11.dir	44	5'-AGAGCTCGAAGATAGTTCTTTAGATAC	SacI
Cry11.rev	1973	5'-GATCTGCAGCTACTTTAGTAACGGATTAATTG	PstI
dII-III.dir	671	5'-AGAGCTCTGTAAAGTCAGTCTTAAAGATG	SacI
F1.dir	143	5'-GGGGTACCGAAAATTTAAATCATTGTCCATTAGAAGAT	KpnI
Cyt.rev	887	5'-ACATGCATGCGAGGGTTCCATTAATAGCGCTAT	SphI
F1.rev	425	5'-ACATGCATGCACCCATCGGTGTAATTGTGTTTGC	SphI
F2.dir	464	5'-GGGGTACCAATAACCAAGTAAAGTGTATGATTAATAAAGTC	KpnI
F3.rev	684	5'-ACAAGCATGCCATTTTTGGATTGCAAAACAGGACATT	SphI
F4.dir	409	5'-GGGGTACCGCAAACACAATTACACCGATG	KpnI
F4.rev	842	5'-ACATGCATGCACTTGAGCTAACTAATGGTTGTGC	SphI
F5.rev	611	5'-ACATGCATGCTGCTTCATTTTTTTGAGTATTTAAATT	SphI
F6.dir	577	5'-GGGGTACCACAAATACGTTTACAAATTTAAATACTCAA	CPU

\*Posición 5' → 3' para cada oligo.

Tabla 2. Oligonucleótidos usados para la amplificación por PCR de los genes de *cryIIAa*, *cytIIAa* y los diferentes fragmentos de ambas proteínas.

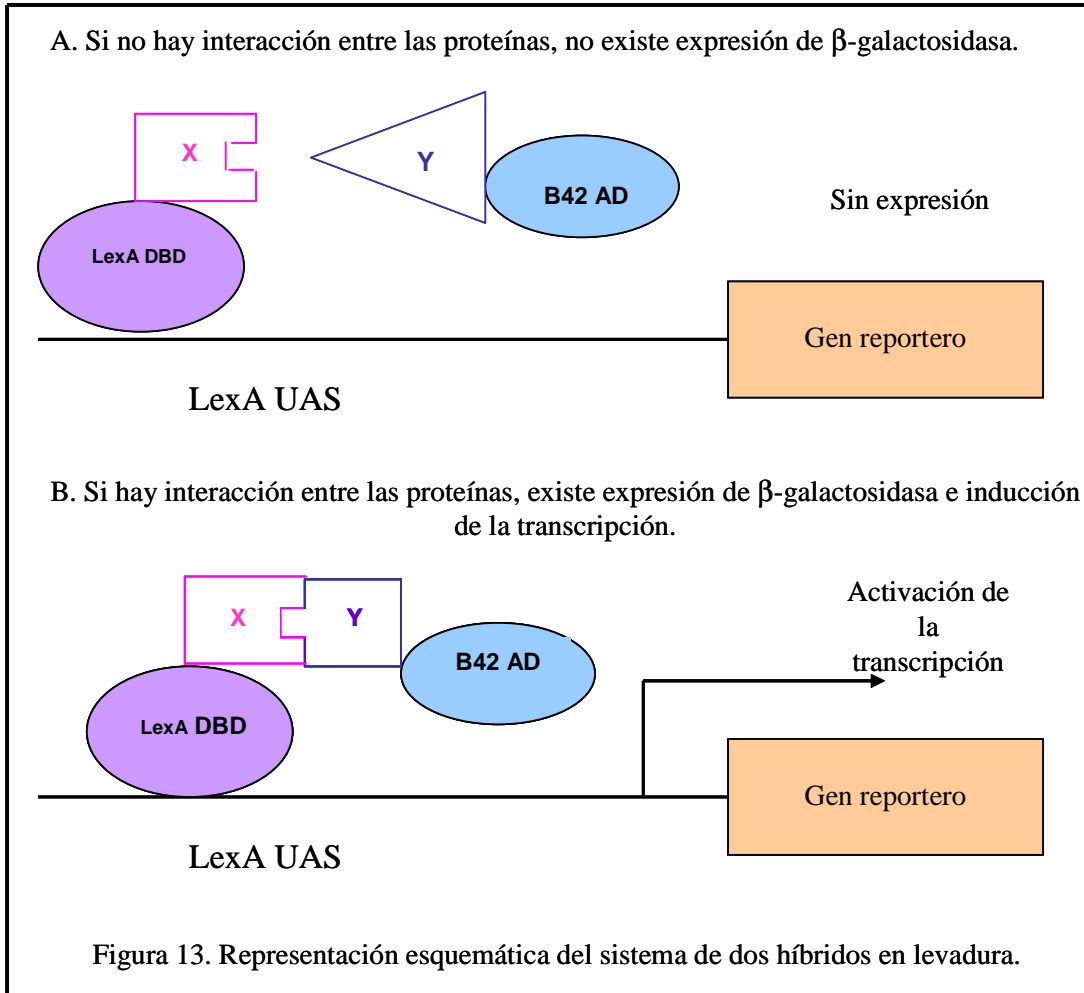
Gen o fragmento de gen amplificado	Oligonucléotidos ocupados	Producto de PCR (pb)	Tm °C
Gen completo <i>cryIIAa</i>	Cry11.dir and Cry11.rev	1929	46
Fragmento con dominios II y III	dIII-III.dir and Cry11.rev	1302	49
Gen completo <i>cytIIAa</i>	F1 dir and cyt.rev	744	55
Fragmento F1, de $\beta$ -1 a $\alpha$ -B	F1dir and F1rev.	282	55
Fragmento F2, de $\alpha$ -C a $\alpha$ -F	F2.dir and Cyt.rev	423	55
Fragmento F3, de $\beta$ -1 a $\beta$ -5	F1.dir and F3.rev	541	55
Fragmento F4, de $\beta$ -3 a $\beta$ -7	F4.dir and F4.rev	433	56
Fragmento F5, de $\alpha$ -C a $\alpha$ -D	F2.dir and F5.rev	147	52
Fragmento F6, de $\beta$ -4 a $\beta$ -7	F6.dir and F4.rev	265	54

Tabla 3. Reacciones de PCR desarrolladas para amplificar el gen completo de *cryIIAa*, *cytIIAa* y sus diferentes fragmentos.

### 5.16 Sistema de dos híbridos en levadura.

El sistema de dos híbridos en levadura es una técnica molecular ampliamente utilizada para comprobar la interacción entre dos proteínas (Golemis *et al.*, 1996; Gyruş, *et al.*, 1993). En esta metodología se construyen proteínas híbridas (quiméricas) compuestas por un dominio de unión a DNA (DNA Binding Domain) y el dominio de activación (Activation Domain) de un factor de transcripción ambos fusionados a una o dos proteínas que interactúan entre sí, y que son denominadas como el dominio anzuelo “bait” y el dominio presa “prey”. Si células de levadura se someten a transfección con genes codificadores de ambos híbridos, las porciones carnada y pez de las proteínas quiméricas interactúan entre sí para producir un activador transcripcional funcional (figura 13B). Un extremo del complejo proteico se fija a la secuencia de activación corriente arriba (UAS) de un gen de prueba (por ejemplo, el gen HIS3); el otro extremo, compuesto por el dominio de activación, estimula el ensamblaje del complejo de inicio

de transcripción en el promotor. En el caso de que las proteínas quiméricas no interactúen entre sí, no habrá expresión de actividad transcripcional que desencadene ningún ensamblaje (figura 13A).

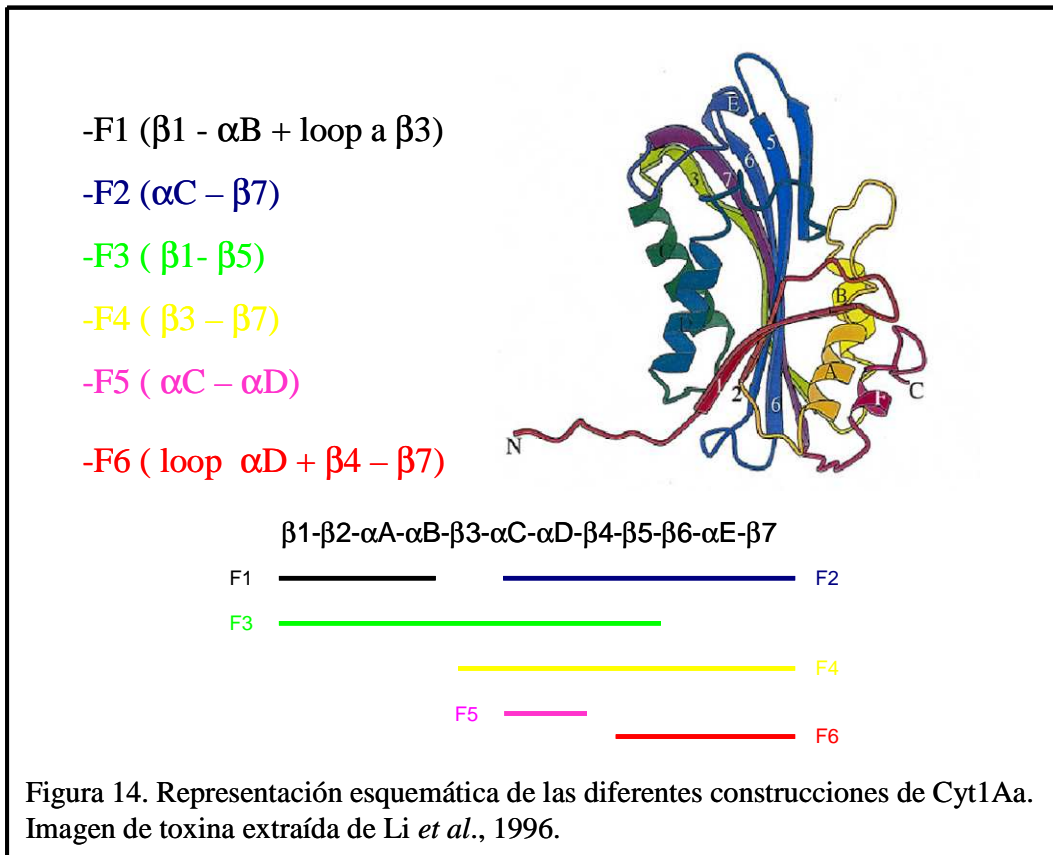


Básicamente el sistema de dos híbridos que nosotros montamos involucró el análisis de la interacción de los dominios II y III de Cry11Aa con diferentes fragmentos de la toxina Cyt1Aa (Figura 14). Previamente también ya habíamos demostrado la interacción entre las proteínas completas, de ahí que se decidiera hacer un análisis más detallado de la posible región de interacción, delimitando regiones en ambas toxinas.

Las dos construcciones del plásmido anzuelo con la toxina Cry11A completa y los dominios II y III de la misma fueron realizados en colaboración con el Dr. Jiang Guang Sun, usando el plásmido pHybLex/Zeo (Invitrogene). Las construcciones que



involucran el plásmido presa con los diferentes fragmentos de la proteína Cyt1Aa se desarrollaron ocupando el vector pYESTrp2 (Invitrogene).



Una vez con las construcciones realizadas, se cotransformó la cepa de levadura *S. cerevisiae* L40, que en su forma silvestre, requiere de los aminoácidos histidina, leucina, triptofano y de la base nitrogenada adenina, para poder crecer. Por ello es que las transformantes positivas se seleccionaron en placa mediante uso de zeocina (300  $\mu\text{g/ml}$ ),  $\text{His}^-$  y  $\text{Trp}^-$ . El antibiótico zeocina es el marcador de resistencia del plásmido anzuelo, la histidina es el marcador de auxotrofia determinado para la levadura L40 y el triptofano es el marcador de resistencia del plásmido presa. Solo si las colonias son capaces de crecer en ausencia de triptofano y en presencia de zeocina, se puede asegurar que se logró la incorporación de los dos plásmidos en la levadura. Sin embargo, esto no basta para que las colonias sean consideradas como candidatas positivas de interacción. Solo si las transformantes son capaces de crecer en ausencia del marcador de auxotrofia Histidina y por ensayo de  $\beta$ -galactosidasa generan coloración azul (por activación de la

transcripción), se podrá considerar a las transformantes como candidatas positivas de interacción.

Las soluciones de aminoácidos utilizadas fueron esterilizadas ocupando filtros milipore de 0.2  $\mu\text{m}$  desechables; triptófano, leucina y adenina fueron ocupados en una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que la histidina se ocupó a una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$ .

### **5.17 Transformación de levadura por método de acetato de litio.**

Un cultivo de doce horas de *S. cerevisiae* L40 fue subcultivado a ( $\text{DO}_{600}=0.07$ ) en medio YDPA y crecido a 30°C hasta conseguir una  $\text{DO}_{600}$  de 0.5. Posteriormente se recuperó el cultivo centrifugando a 3000x g por 1'. Se agregó al pellet de células los siguientes reactivos: 240  $\mu\text{l}$  de PEG-3350 al 50%, 36  $\mu\text{l}$  de LiAc 1.0 M, 50  $\mu\text{l}$  de ss-DNA (2 mg/ml), 10  $\mu\text{l}$  del DNA deseado (0.1-5.0  $\mu\text{g}$ ) y 24  $\mu\text{l}$  de agua MQ estéril. Se agitó vigorosamente para resuspender. Se incubó 30' a TA y posteriormente se dio un choque térmico a las células en un baño de agua a 42°C por 30'. Se centrifugaron las células a 14000 x g por 1' y se removió la mezcla de transformación. Se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de medio YDPA y resuspendieron suavemente con micropipeta. Se pasó esta mezcla a un tubo de vidrio, al cual se le agregaron 1.5 ml más de YDPA. Se dejó incubar 3 h a 30°C. Se centrifugó en microcentrífuga a máxima velocidad por 1' y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió suavemente con micropipeta en 500  $\mu\text{l}$  de agua estéril, para posteriormente colocarse en cinco cajas petri con el medio de selección SC y los aminoácidos y antibiótico correspondientes. En la primera caja se colocaron 200  $\mu\text{l}$  de cultivo, en las dos siguiente 100  $\mu\text{l}$  y en las dos restantes 50  $\mu\text{l}$ , esto con el fin de elegir aquella en donde se observaran colonias aisladas. Se incubó a 30°C durante 4 a 6 días. (Agatep *et al.*, 1998).

### **5.18 Extracción de DNA plasmídico a partir de levadura.**

Se creció la levadura *S. cerevisiae* L40 en 1.5 ml de medio YDPA por 12 horas. Se recuperaron las células por centrifugación, 5000x g, por 5'. Después se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de buffer STET (8% de sacarosa, 50 mM de Tris pH 8.0, 50 mM de EDTA, 5% de tritón X-100) y se agregaron 0.2 g de perlas de vidrio de 0.45 mm. Se agitó vigorosamente por 5'. Después se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  más de STET, volviendo a agitar

brevemente con vórtex y se colocó en un baño de agua hirviendo por 3'. Se enfrió en hielo por unos segundos y se centrifugó 10' a 4°C. Se transfirieron 100 µl del sobrenadante a un tubo que contenía 50 µl de 7.5 M de acetato de amonio, precongelado a -20°C por 1 h y se centrifugó por 10' a 4°C. Se agregaron 100 µl del sobrenadante a 200 µl de etanol precongelado y se recuperó el DNA por centrifugación. Se lavó con 70% de etanol y se recuperó el DNA por centrifugación. Se seca el pellet obtenido y se resuspende en 200 µl de buffer TE. De dicho DNA, se usaron 10 µl para transformar células competentes de *E. coli*.

### **5.19 Prueba cualitativa de expresión de β-galactosidasa en levadura (ensayo de filtro).**

Se agregó nitrógeno líquido a un contenedor. Se colocó un trozo de membrana de nitrocelulosa Hybond-C (Amersham) sobre las colonias de levaduras a probar. Se preparó una caja petri con 3.5 ml de buffer Z (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.0) y 350 µl de X-gal 20 mg/ml. Se mezcló bien y luego se colocó cuidadosamente papel filtro Whatman #1 sobre la solución de buffer Z y X-gal tratando de evitar la formación de burbujas. Se removió cuidadosamente la nitrocelulosa que está sobre las colonias y se colocó dentro del contenedor con nitrógeno líquido. Se dejó flotar sobre papel aluminio por 30' y posteriormente se hundió por 5". Se retiró la nitrocelulosa y se esperó a que el filtro se descongelara. Posteriormente se colocó cuidadosamente la membrana de nitrocelulosa sobre el papel filtro (siempre con las colonias viendo hacia arriba) evitando hacer burbujas. Se cubrió la caja petri con aluminio y luego se incubó a 30°C y se esperó a que se muestre la coloración azul característica de la prueba, la cual puede darse en los primeros 30' ó hasta 12 horas después, dependiendo la intensidad de la interacción.

### **5.20 Unión de Cry11A a péptidos inmovilizados en membrana de nitrocelulosa por síntesis SPOT.**

Péptidos lineales de Cyt1Aa fueron inmovilizados en una membrana de nitrocelulosa por Jerini AG (Peptide Technologies, Berlin, Germany) a través de síntesis SPOT automatizada (Kramer y Schneider-Mergener, 1998). Posteriormente la membrana fue lavada con etanol y buffer TBS (50 mM de Tris, 137 mM de NaCl, 2.7

mM de KCl, pH 8) para posteriormente bloquear con TBS, 0.1% Tween 20 y 5% de leche por 16 h a 4°C. La membrana fue lavada nuevamente con TBS, Tween 20 0.1% para retirar los restos de bloqueo, para después incubar con 20 µg/ml de Cry11Aa biotinilada a 4°C por 4 h. Posteriormente se incubó 1 h con SAPO (1:6000) y se reveló la señal obtenida con reactivos quimioluminiscentes.

### 5.21 Mutagénesis sitio-dirigida.

La mutagenesis del plásmido pWF45 que codifica para la proteína Cyt1Aa se realizó ocupando el kit QuickChange XL de Stratagene. Todos los cambios fueron por el aminoácido alanina. Para cada mutante se diseñaron oligonucleótidos específicos para obtener por PCR el DNA mutado (tabla 4). El producto de PCR se transformó en *E. coli* XL1-Blue, para después, extraer DNA de las colonias obtenidas y secuenciarlo con el fin de verificar el cambio esperado. Posteriormente se transformó el DNA mutado en la cepa de Bt acristalífera 407 para la expresión y purificación de las proteínas. Por su parte, las mutantes en Cry11Aa fueron amablemente proporcionadas por la Dra. Luisa Elena Fernández (Fernández *et al.*, 2005).

Oligo	Secuencia	Tm °C
E196A	5'-ATTGTGTACCAGTTGGTTTTGCAATTAAGTATCAGCAGTAAAGG	78.9
E196A r	5'-CCTTTACTGCTGATACTTTAATTGCAAAACCAACTGGTACACAAT	78.9
K198A	5'-GTGTACCAGTTGGTTTTGAAATTGCAGTATCAGCAGTAAAGGAACAA	78.6
K198A r	5'-TTGTTCCCTTACTGCTGATACTGCAATTTCAAACCAACTGGTACAC	78.6
K203A	5'-GGTTTTGAAATTAAGTATCAGCAGTAGCGGAACAAGTTTTATTTTCACAATTCAA	78.4
K203A r	5'-TTGAATTGTGAAAAATAAACTTGTCCGCTACTGCTGATACTTTAATTTCAAAC	78.4
E204A	5'-TGAAATTAAGTATCAGCAGTAAAGGCACAAGTTTTATTTTCACAATTCAAG	78.5
E204A r	5'-CTTGAATTGTGAAAAATAAACTTCTGCCTTACTGCTGATACTTTAATTTCA	78.5
K225A	5'-CTACAATGTTAACATCCAATCTTTGGCATTGCAACAACCATTAGTTAGCTC	79.6
K225A r	5'-GAGCTAACTAATGGTTGTGCAAAATGCCAAAGATTGGATGTTAACATTGTAG	79.6

\*Posición 5' → 3' para cada oligo. r = oligonucleótido antisentido ó reverso.

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos usados por PCR para la obtención de proteínas mutantes de Cyt1Aa.

### **5.22 Determinación de las constantes de afinidad entre las proteínas Cry y Cyt por ensayo de ELISA competitiva.**

Para determinar la constante de disociación aparente ( $K_d$ ) observada en la interacción de las diferentes proteínas, 10 nM de Cyt1Aa silvestre y sus mutantes (K118, E204A y K225A) fueron incubadas individualmente con concentraciones crecientes de Cry11Aa silvestre y sus mutantes S259A y E266A (de 0.1 nM a 1  $\mu$ M) en un volumen de 100  $\mu$ l por 1 h a temperatura ambiente. Las mezclas incubadas fueron transferidas a una placa de ELISA previamente incubada con 2.5  $\mu$ g de la toxina Cyt1Aa silvestre. La concentración de Cry11Aa silvestre (o de sus mutantes) a la cual se observe la señal media corresponde a la  $K_d$  aparente (Dong *et al.*, 2003).

### **5.23 Preparación de vesículas unilamelares pequeñas (SUV).**

Se realiza una mezcla de fosfatidilcolina (PC), colesterol (Ch) y estearilamina (S) en un matraz de vidrio de 5 ml en una proporción de 10:3:1 respectivamente, para llevarlos a una concentración final de 1.9:0.5:0.2  $\mu$ M respectivamente (concentración final de la mezcla 2.6  $\mu$ M). Posteriormente son secados con argón y colocados a vacío durante 12 horas para remover los restos de cloroformo del almacenamiento inicial. Una vez secos, los lípidos son hidratados en 2.6 ml de 10 mM HEPES 150 mM KCl pH 7 ó 10 mM CHES, 150 mM KCl pH 9 e incubados por 30 min con vortexeo ocasional. Por último, se somete a la muestra a un proceso de sonicación durante 5 minutos en un equipo Branson-1200 durante 5 veces con intervalos de 1 minuto en hielo entre sonicación y sonicación. Los SUV pueden ocuparse hasta 3 días después de su preparación.

### **5.24 Ensayo de oligomerización de Cry11Aa.**

El oligómero de Cry11Aa fue producido en presencia de VMMA de *Ae. aegypti* y SUV. En el primer caso, 10  $\mu$ g de Cry11Aa en su forma de protoxina soluble, fueron incubados 1 h a 37°C con tripsina en una proporción 1:50 (proteasa/proteína) y 10  $\mu$ g de VMMA de *Ae. aegypti* en un volumen final de 100  $\mu$ l de 50 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 10.5. En algunos casos, la activación se hizo también en presencia de 5  $\mu$ g Cyt1Aa en su forma

de toxina. La reacción de activación fue detenida usando PMSF 1 mM y se separó la fracción soluble de la insoluble por centrifugación 1 h a 50000 x g, para después someter al sobrenadante a un ensayo de Western Blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-Cry11A. Por su parte, la activación ocupando SUV se realizó de la siguiente manera: 2.5 µg de protoxina soluble de Cry11Aa se incubaron durante 2 h a 37 °C con 200 µM SUV, tripsina 1:50 (peso/peso), en presencia y ausencia de 0.5 µg Cyt1Aa activada, en un volumen final de 100 µl de 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 10.5. La reacción de activación fue detenida usando PMSF 1 mM y el pellet se obtuvo centrifugando 1 h a 100000 x g, para después resuspenderlo en PBS 1x si la muestra se ocupa para detectar el oligómero por western blot ó en buffer 150 mM KCl, CHES 10 mM, pH 9, si la muestra será utilizada para ensayos de permeabilidad a membrana. En ambos casos, el pellet resuspendido fue sometido a una temperatura de 100°C durante 4 min con el fin de desnaturalizar las proteínas en estado monomérico que aun permanecieran en la muestra.

### **5.25 Ensayos de permeabilización a membrana (medidas de fluorescencia)**

El potencial de membrana en SUV cargados con 10 mM de HEPES y 150 mM de KCl pH 7.0, se obtuvo monitoreando la partición del colorante fluorescente cargado positivamente 3-3'-dipropil-tiodicarbocianina [dis-C3-(5)] (SIGMA) a una concentración final de 1.2 µM. La fluorescencia fue medida a  $\lambda$  620/670 nm excitación/emisión. Los ensayos se realizaron en un volumen de 900 µl de buffer de 150 mM de cloruro de *N*-metil-D-glucamina, 10 mM de HEPES y 2 mM de CaCl<sub>2</sub> pH 7 en una cubeta de vidrio de 1 cm de longitud a 25°C con agitación constante. Se adicionó cianina (1.2 µM), después 10 µM de SUV, esperando a que el colorante alcance el equilibrio (1 min). Posteriormente, se agregó la valinomicina o toxina, que produjo una hiperpolarización de la membrana debido a la salida de iones K<sup>+</sup> del interior de las vesículas. Esto provocó la entrada del colorante tipo cianina en SUV generando un decremento en el índice de fluorescencia. La depolarización produjo el efecto contrario. La calibración del colorante y la determinación del potencial de membrana restante se desarrollaron en presencia de valinomicina (0.1 µM) por adiciones sucesivas de KCl (F<sub>n1</sub>=1, F<sub>n2</sub>=2.5, F<sub>n3</sub>=6, F<sub>n4</sub>=12.5, F<sub>n5</sub>=26, F<sub>n6</sub>=52, mM concentración final) en SUV.

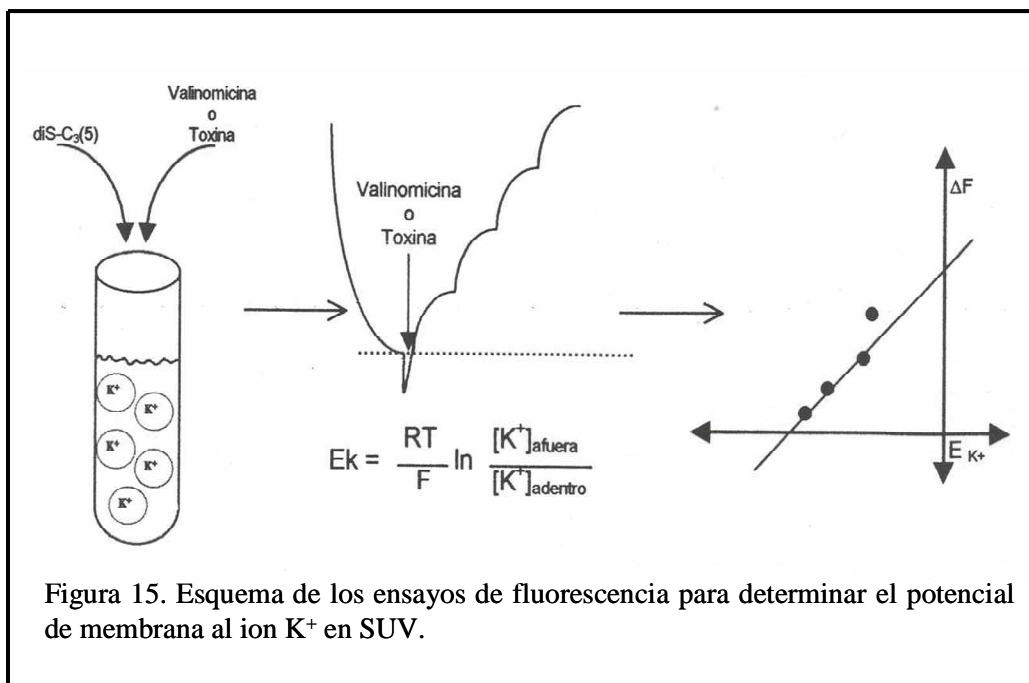


Figura 15. Esquema de los ensayos de fluorescencia para determinar el potencial de membrana al ion  $K^+$  en SUV.

Los cambios en señal fueron normalizados como el porcentaje de cambios en unidades arbitrarias de fluorescencia determinadas por el fluorímetro. Al graficar dicho porcentaje de cambios ( $\% \Delta FAU$ ) vs. la concentración de  $K^+$  fuera de las vesículas, se genera una curva cuya pendiente ( $m$ ) es directamente proporcional al grado de permeabilidad que el ionóforo produce sobre la membrana (Figura 15). Estos ensayos fueron realizados al menos cuatro veces para validar su significado estadístico.

Para analizar los datos proporcionados por el fluorómetro y obtener la pendiente de la recta obtenida de graficar potencial de  $K^+$  contra incremento en fluorescencia por acción de valinomicina se realizó lo siguiente:

Volumen de buffer de cloruro de *N*-metil-D-glucamina = 900  $\mu$ l

Volumen de VMMA's correspondientes a 10  $\mu$ g (stock 1.56  $\mu$ g/ $\mu$ l) = 6.4  $\mu$ l

Volumen de cianina = 1  $\mu$ l

**Volumen final de reacción = 907.4  $\mu$ l**

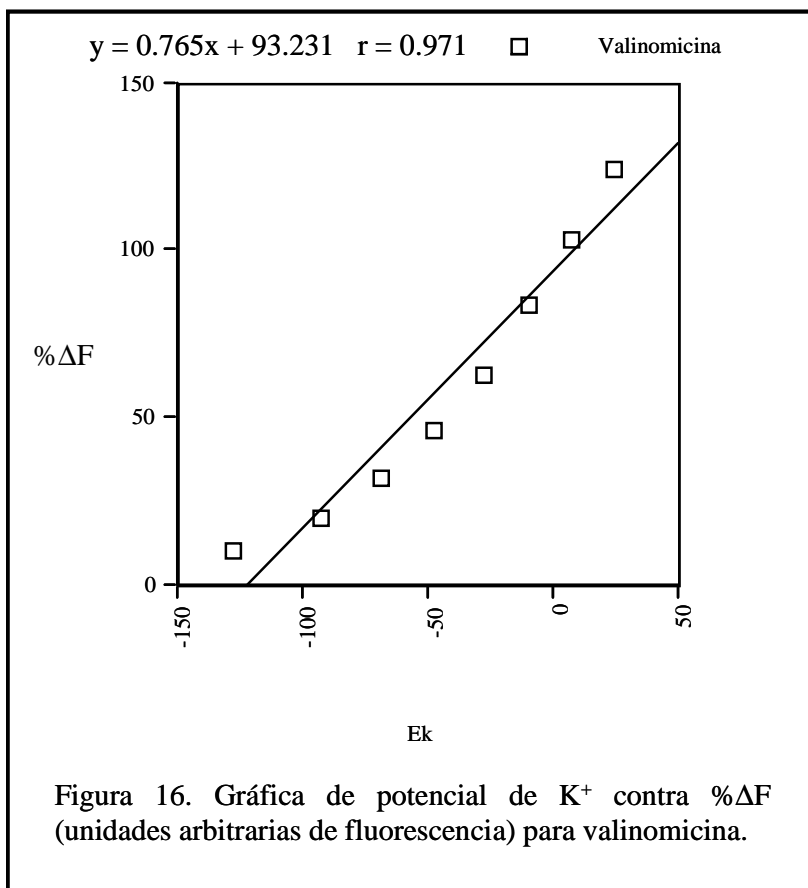
A partir del volumen final de 907.4  $\mu$ l, se determinó cómo se incrementó el volumen de reacción conforme se agregó KCl 3 M. Así mismo, se determinó el cambio en concentración de  $K^+$  externo inducido por valinomicina tomando en consideración la fórmula  $C_1V_1=C_2V_2$ . Con esos datos se determinó el  $E_K$  ( $E_K=25.69 \cdot \ln [K^+]_e/[K^+]_i$ ) y el porcentaje de incremento en fluorescencia ( $\% \Delta F=(F_n - F_o) \cdot 100$ ). La tabla 5 resume los datos obtenidos.

Volumen en $\mu$ l de KCl 3 M agregado	Volumen final de reacción en $\mu$ l	$[K^+]_e$ mM	$E_K$	$F_n$	$\% \Delta F$
0	907.4	1	-128.72	1.78	10
1	908.4	4	-93.10	1.90	22
2	910.4	10	-69.56	2.00	32
4	914.4	23	-48.17	2.14	46
8	922.4	49	-28.74	2.31	63
16	938.4	100	-10.41	2.52	84
32	970.4	198	7.13	2.71	103
64	1034.4	383	24.08	2.92	124

Tabla 5. Análisis de datos de permeabilidad a  $K^+$  por acción de valinomicina en SUV. El valor de  $[K^+]_i$  es siempre 150 mM, pues se cargaron las VMMA's de *A. aegypti* con dicha concentración de KCl. Los valores de  $F_n$  y  $F_o$  son proporcionados por el fluorómetro.  $F_o$  es la fluorescencia inicial con la que se comenzó el ensayo y se mantiene constante. En este caso  $F_o$  tuvo un valor de 1.68.



La gráfica obtenida para valinomicina (control positivo) se muestra a continuación:



Los experimentos de liberación de calceína fueron desarrollados según Rausell y colaboradores. SUV cargadas con 80 mM de calceína fueron preparadas por sonicación durante 3' por 30'' de descanso en presencia de buffer 150 mM KCl, 10 mM CHES, pH 9. La calceína que no fue atrapada dentro de las vesículas se removió de la muestra por filtración en gel haciendo uso de una columna empacada con sephadex G-50 (1 cm x 30 cm) y eluída en el mismo buffer. El ensayo de liberación de calceína se llevó a cabo de la siguiente manera: 100  $\mu$ l de SUV cargadas con calceína fueron adicionados a 900  $\mu$ l de buffer 150 mM KCl, CHES 10 mM, pH 9. La muestra de oligómero de Cry11Aa en presencia de Cyt1Aa y de las proteínas ocupadas individualmente se agregaron para determinar su capacidad de liberar el colorante. La liberación de calceína genera

incrementos en fluorescencia debido a la formación de poros que permiten su salida hacia el solvente. Las longitudes de onda ocupadas para la determinación de la fluorescencia fueron de 490/520 nm (excitación/emisión) ocupando un fluorímetro Aminco Bowman. La máxima liberación de fluorescencia se verifica al final de cada experimento agregando 0.1% Triton-X-100 (concentración final). Todos los experimentos fueron realizados por cuadruplicado a temperatura ambiente.

## 6. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación involucran siete apartados principales:

- 1) Bioensayos y pruebas de sinergismo entre Cry11Aa y Cyt1Aa.
- 2) Ensayos para determinar la posible interacción proteína/proteína entre Cry11Aa y Cyt1Aa partir de experimentos de unión secuencial en VMMA de *Ae. aegypti*, ligand blot, ELISA y coimmunoprecipitación.
- 3) Identificación de los sitios de interacción entre ambas proteínas por medio de la técnica de sistema de dos híbridos en levadura y uso de péptidos inmovilizados en membrana de nitrocelulosa por síntesis SPOT (Pept Spot).
- 4) Mutagénesis sitio-dirigida en los sitios de interacción entre Cry11Aa y Cyt1Aa para evaluar por bioensayos el efecto que dichos cambios generen en el proceso de sinergismo.
- 5) Análisis de la participación de Cyt1Aa en el proceso de oligomerización de Cry11Aa en solución y en presencia de membranas (VMMA de *Ae. aegypti* y SUV).
- 6) Evaluación de la actividad formadora de poro del oligómero de Cry11Aa por ensayos de permeabilización a membrana del ion  $K^+$  y liberación de calceína en SUV.
- 7) Establecimiento de una posible correlación entre el fenómeno de oligomerización de Cry11Aa y su habilidad para sinergizar con Cyt1Aa ocupando para ello a las proteínas mutantes afectadas en interacción.

El primer apartado involucra el análisis del sinergismo existente entre las toxinas Cry11Aa y Cyt1Aa producidas por Bti, las cuales se eligieron como modelo para la realización de este trabajo debido a que son tóxicas contra larvas del mosquito *Ae. aegypti* y presentan un alto nivel de sinergismo en combinación a nivel bioensayo (Wu *et al.*, 1994). El resto de los apartados están enfocados a demostrar y soportar la hipótesis presentada en el trabajo sobre la interacción proteína-proteína que puede llevarse a cabo entre estas dos  $\delta$ -endotoxinas de Bti,

con el fin de sustentar experimentalmente la hipótesis de que Cyt1Aa puede funcionar como un receptor de Cry11Aa, y que incluso puede favorecer eventos de vital importancia en el mecanismo de acción general de las toxinas Cry como sería la formación de una estructura de pre-poro.

### 6.1 Bioensayos y pruebas de sinergismo entre Cry11Aa y Cyt1Aa.

Trabajos previos demostraron que la proteína Cyt1Aa sinergiza la actividad de las toxinas Cry de Bti (Crickmore *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1993; Wu y Chang, 1985). No obstante, para el desarrollo de este trabajo era necesario que bajo las condiciones propias de nuestro laboratorio se calculara el grado de actividad de las toxinas elegidas y su habilidad para sinergizar contra larvas de *Ae. aegypti*.

Por lo anterior, los bioensayos para determinar la actividad tóxica de Cry11Aa y Cyt1Aa se realizaron en 100 ml de agua, con larvas de 4° estadio de *Ae. aegypti* y utilizando esporas/cristales de cada una de las proteínas en diez diferentes dosis con 4 repeticiones cada una. El control positivo fue Bti (HD916) y el negativo buffer de almacenamiento de las proteínas (agua destilada con 1 mM de PMSF). Para cada toxina de manera individual, se determinó su dosis letal media (LC<sub>50</sub>) que se define como la dosis a la cual se produce la muerte del 50% de los individuos de la población total tratada. A continuación se muestran los datos de mortalidad de larvas de *Ae. aegypti* obtenidos en los diferentes bioensayos para Cyt1Aa.

Dosis (ng/ml)	Bioensayo 1 No. de muertos	Bioensayo 2 No. de muertos	Bioensayo 3 No. de muertos	Bioensayo 4 No. de muertos	Total de muertos	% mortalidad Promedio
3000	10/10	10/10	10/10	10/10	40/40	100.0
2500	7/10	6/10	4/10	6/10	23/40	53.50
2000	6/10	5/10	5/10	5/10	21/40	52.50
1500	4/10	5/10	5/10	6/10	20/40	50.00
1000	3/10	2/10	1/10	4/10	10/40	25.00
500	2/10	2/10	2/10	2/10	8/40	20.00
100	2/10	1/10	2/10	2/10	7/40	17.50
50	1/10	1/10	0/10	2/10	4/40	10.00
10	0/10	1/10	0/10	0/10	1/40	2.50
5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/40	0.00

Tabla 6. Toxicidad de Cyt1Aa contra larvas de *Ae. aegypti*

A partir del análisis estadístico de los datos de la tabla 6 por el programa POLO de LeOra Software, se determinó que la  $LC_{50}$  para la toxina Cyt1Aa fue de 1244.6 ng/ml (límites de confianza: 909.9–1423.1), cantidad que comparada con las dosis letal de otras toxinas Cry activas contra mosquitos ( $LC_{50}$  Cry4Ba=467 ng/ml, Crickmore *et al.*, 1995) es considerablemente mayor, por lo que se puede concluir que esta toxina es poco tóxica contra larvas del 4º estadio de *Ae. aegypti*.

La  $LC_{50}$  para Cry11Aa tomando en consideración los datos de la tabla 7 y el resultado arrojado por el programa POLO sería de 235.9 ng/ml (límites: 102.4–499.6). Este valor es menor que la  $LC_{50}$  de Cyt1Aa, por lo que se sustenta que la toxina Cry11Aa es al menos 5 veces más tóxica que Cyt1Aa contra larvas de *Ae. aegypti*.

Dosis (ng/ml)	Bioensayo 1 No. de muertos	Bioensayo 2 No. de muertos	Bioensayo 3 No. de muertos	Bioensayo 4 No. de muertos	Total de muertos	% mortalidad promedio
1200	10/10	10/10	10/10	10/10	40/40	100.00
1000	9/10	10/10	10/10	10/10	39/40	97.50
800	7/10	9/10	10/10	9/10	35/40	87.50
600	6/10	7/10	8/10	6/10	27/40	67.50
400	5/10	5/10	4/10	5/10	23/40	57.50
200	4/10	4/10	3/10	4/10	18/40	45.00
100	4/10	2/10	5/10	2/10	10/40	25.00
80	2/10	3/10	3/10	2/10	8/40	20.00
60	1/10	2/10	1/10	1/10	2/40	5.00
40	1/10	0/10	0/10	1/10	0/40	0.00

Tabla 7. Toxicidad de Cry11Aa contra larvas de *Ae. aegypti*

En el caso de Bti, que es la cepa silvestre que produce las toxinas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, Cry10Aa, Cyt1Aa y Cyt2Ba, el efecto tóxico fue considerablemente más elevado, lo cual se debe a la presencia del cristal paraesporal completo, de ahí que se use como control positivo en este tipo de bioensayos. Los altos porcentajes de mortalidad obtenidos a dosis bajas (25 ng/ml), se muestran en la tabla 8. La  $LC_{50}$  determinada por el programa POLO para Bti contra larvas de *Ae. aegypti* fue de 7.0 ng/ml (límites: 4.9 a 8.9), aproximadamente 180 veces más toxica que la proteína Cyt1Aa y 34 veces más toxica que Cry11Aa.

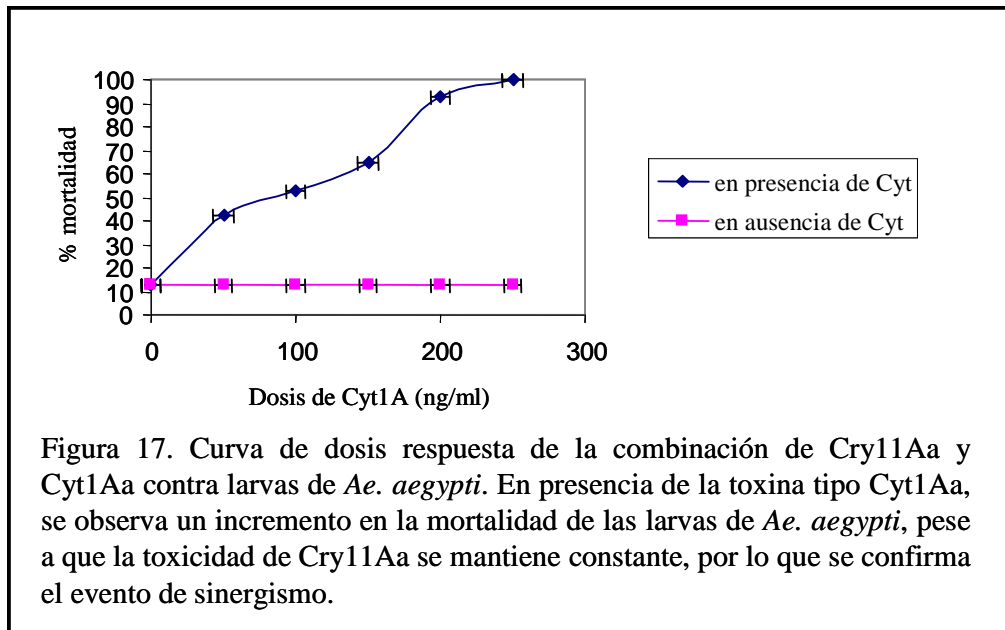
<b>Dosis (ng/ml)</b>	<b>Bioensayo 1 No. de muertos</b>	<b>Bioensayo 2 No. de muertos</b>	<b>Bioensayo 3 No. de muertos</b>	<b>Bioensayo 4 No. de muertos</b>	<b>Total de muertos</b>	<b>%mortalidad promedio</b>
25.0	10/10	10/10	10/10	10/10	40/40	100.00
22.5	10/10	10/10	10/10	9/10	39/40	97.50
20.0	9/10	9/10	9/10	9/10	36/40	90.00
17.5	9/10	9/10	8/10	9/10	35/40	87.50
15.0	8/10	8/10	9/10	7/10	32/40	80.00
12.5	7/10	7/10	6/10	5/10	25/40	62.50
10.0	5/10	5/10	5/10	5/10	20/40	50.00
7.5	4/10	5/10	4/10	4/10	17/40	42.50
5.0	3/10	4/10	4/10	3/10	14/40	35.00
2.5	2/10	4/10	2/10	2/10	10/40	25.00

Tabla 8. Toxicidad de Bti contra larvas de *Ae. aegypti*

Con el fin de investigar el posible efecto sinérgico entre Cyt1Aa y Cry11Aa, se realizaron bioensayos con mezclas de ambas toxinas. Ocupando larvas del 4° estadio de *Ae. aegypti* y tomando en cuenta los porcentajes de mortalidad ya mencionados, se sometió a las larvas a una dosis inicial de 50 ng/ml de Cry11Aa, que individualmente genera un porcentaje de mortalidad aproximado de 10%, y a partir de dicho punto, se agregaron dosis crecientes de la toxina Cyt1Aa, que de manera individual son completamente inocuas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9 y en la figura 17:

<b>Dosis (ng/ml) Cry:Cyt</b>	<b>Ensayo1 No. de muertos</b>	<b>Ensayo2 No. de muertos</b>	<b>Ensayo 3 No. de muertos</b>	<b>Ensayo4 No. de muertos</b>	<b>Total de muertos</b>	<b>% mortalidad promedio</b>
50: 00	2/10	1/10	1/10	1/10	5/40	12.50
50: 50	4/10	5/10	5/10	3/10	17/40	42.50
50:100	5/10	6/10	5/10	5/10	21/40	52.50
50:150	5/10	7/10	7/10	7/10	26/40	65.00
50:200	9/10	8/10	10/10	10/10	37/40	92.50
50:250	10/10	10/10	10/10	10/10	40/40	100.00

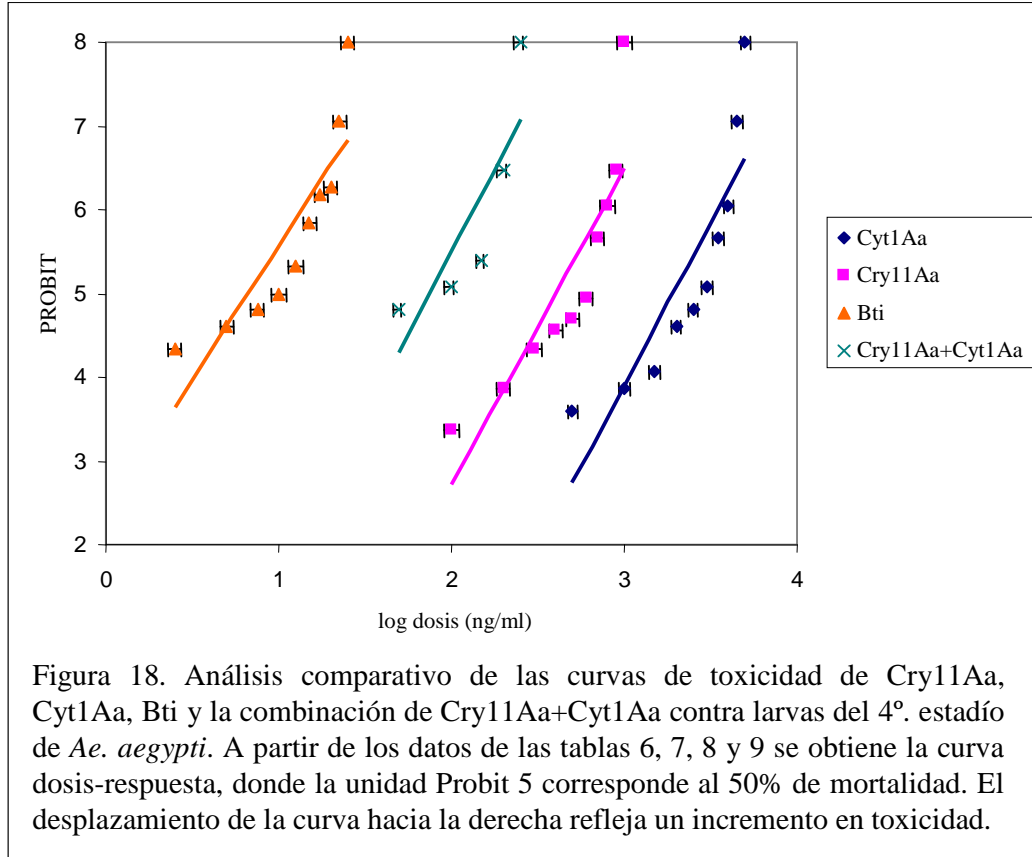
Tabla 9. Toxicidad de la combinación de dosis crecientes de Cyt1Aa con Cry11Aa contra larvas de *Ae. aegypti*.



Como se puede observar en la figura 17, manteniendo una dosis constante de Cry11Aa de 50 ng/ml, que causó el 12.5% de mortalidad, y adicionando dosis crecientes de Cyt1Aa que teóricamente no rebasan el 10% de mortalidad a la máxima concentración, la actividad tóxica hacia larvas del 4º estadio de *Ae. aegypti* incrementó notablemente. Por ejemplo, en el caso de la combinación de 50 ng/ml de Cry11Aa (12.5% mortalidad) y 100 ng/ml de Cyt1Aa (4% mortalidad), teóricamente tendríamos un valor de 16.5% de mortalidad final. No obstante, en el bioensayo se obtuvo un 52.5% de mortalidad (tabla 9). El efecto anterior no podría ser de ningún modo aditivo, pues la mortalidad que se obtiene para ambas toxinas (52.5%) supera en mucho la suma teórica de 16.5%, lo cual demuestra el sinergismo existente entre las toxinas Cry11Aa y Cyt1Aa a partir de bioensayos, incluso a dosis que son inocuas de manera individual.

Las curvas de mortalidad normalizadas por PROBIT del efecto tóxico de Cry11Aa, Cyt1Aa, Bti y la combinación de ambas toxinas se muestran en la figura 18. Como podemos observar, la curva que representa la combinación de Cry11Aa y Cyt1Aa se encuentra desplazada a la izquierda llegando a un valor de 1.8 (log dosis), en comparación con las curvas que representan a las proteínas individuales (2.6 para Cry11Aa y 3.3 para Cyt1Aa). No obstante, su desplazamiento no es tan pronunciado como el que mostró Bti (0.8 log dosis), por consiguiente se confirma el hecho de que las

toxinas Cry11Aa y Cyt1Aa de Bti actúan sinérgicamente cuando se encuentran en combinación, pero no presentan un efecto superior al observado usando el cristal nativo completo, que además contiene las toxinas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa y Cyt2Ba.



Para dar un valor definido al incremento en toxicidad de la combinación de Cry11Aa y Cyt1Aa se requiere calcular el factor de sinergismo a partir de la ecuación de Tabashnik (a) (Tabashnik, 1992). Dicha ecuación determina teóricamente la dosis letal media de una mezcla de dos o más toxinas, asumiendo un efecto aditivo entre sus componentes de acuerdo a proporciones previamente establecidas y al valor de  $LC_{50}$  obtenida de forma individual a través de bioensayos y análisis estadístico PROBIT.

$$LC_{50 \text{ teórica}} (a+b) = \left[ \frac{ra}{LC_{50} (a)} + \frac{rb}{LC_{50}(b)} \right]^{-1} \quad (a)$$

a: Toxina 1  
b: Toxina 2  
r: proporción  
 $LC_{50}$ : dosis letal media



Si se relaciona el valor obtenido en (a) con la LC<sub>50</sub> práctica obtenida por bioensayos *in vivo* a través de un análisis tipo PROBIT, se obtiene un factor de actividad (FS) que indica, directamente, si la mezcla de toxinas sinergizan (b). En caso de que el valor de FS obtenido sea mayor a 1, se observa sinergismo; si es igual a 1, se tiene un efecto aditivo, y si el valor es menor a 1, observamos un efecto antagónico.

$$FS = \frac{LC_{50} \text{ teórica}}{LC_{50} \text{ práctica}} \quad (b)$$

Tomando en consideración lo anterior, se desarrollaron bioensayos para calcular el factor de sinergismo entre las proteínas Cyt1Aa y Cry11Aa sobre larvas del 4º. estadio de *Ae. aegypti* de acuerdo al siguiente ejemplo:

Si sabemos que la LC<sub>50</sub> práctica de Cyt1Aa es de 1244.6 ng/ml y la LC<sub>50</sub> práctica de Cry11Aa es de 235.9 ng/ml (ambos datos calculados por el programa POLO de análisis PROBIT), podemos decir que Cry11Aa es aproximadamente 5 veces más tóxica que Cyt1Aa. Por ello, conservando dichas proporciones, al despejar la ecuación (a) tendríamos que el valor de LC<sub>50</sub> teórico para la combinación sería de 121.12 ng/ml.

$$LC_{50} (\text{Cry11A+Cyt1A}) = \left[ \frac{1}{235.9} + \frac{5}{1244.6} \right]^{-1} = \frac{121.12 \text{ ng/ml}}{LC_{50} \text{ teórica}}$$

Si por análisis PROBIT de los datos obtenidos en el bioensayo, obtenemos que la LC<sub>50</sub> práctica de la mezcla entre Cry11Aa y Cyt1Aa es de 54.80 ng/ml, entonces, despejando en la fórmula (b), tendríamos que el FS sería igual a 2.21.

$$FS = \frac{121.12}{54.80} = 2.21$$

Dado que el valor obtenido es mayor a 1, podemos decir que la mezcla de las toxinas Cry11Aa y Cyt1Aa, a una relación de 1:5, presenta un efecto sinérgico contra larvas del cuarto estadio de *Ae. aegypti* de aproximadamente 2 veces más del valor teórico esperado. No obstante, según consideraciones del mismo Tabashnik, el factor de sinergismo puede apreciarse en un rango más amplio de actividad, si se ocupan concentraciones subletales del componente menos activo de la combinación a probar, que en nuestro caso sería Cyt1Aa. De esta forma, de observarse un efecto sinérgico considerable entre Cry11Aa y Cyt1Aa, este se apreciaría más disminuyendo la proporción del componente menos tóxico.

Para demostrar lo anterior se ocuparon diferentes proporciones de Cyt1Aa (1.0, 0.5 y 0.2) manteniendo constante en la mezcla la proporción de 1.0 de Cry11Aa. Los resultados obtenidos se enlistan en la tabla 10 y muestran que el efecto de sinergismo entre las proteínas es más apreciable conforme disminuye la proporción de Cyt1Aa, lo que podría indicarnos que *in vivo*, no se necesita de una concentración alta de esta proteína para observar su efecto sinérgico con Cry11Aa.

Combinación	Proporción	LC <sub>50</sub> teórica (ng/ml)	LC <sub>50</sub> práctica (ng/ml)	FS
Cyt1Aawt: Cry11Awt	5.0:1.0	121.12	54.80 (22.1-89.9) <sup>a</sup>	2.2
Cyt1Aawt: Cry11Awt	1.0:1.0	198.30	57.40 (31.7-90.4) <sup>a</sup>	3.5
Cyt1Aawt: Cry11Awt	0.5:1.0	215.50	26.06 ( 6.1-51.0) <sup>a</sup>	8.3
Cyt1Aawt: Cry11Awt	0.2:1.0	227.30	12.13 (0.45-30.8) <sup>a</sup>	18.7

Tabla 10. Factores de sinergismo obtenidos para la combinación de Cry11Aa y Cyt1Aa a tres diferentes radios de proporción 5.0:1.0, 1.0:1.0, 0.5:1.0 y 0.2:1.0.

wt, proteína silvestre. <sup>a</sup> Límites de confianza.

Gracias a los resultados mostrados anteriormente, podemos establecer que la actividad individual de Cry11Aa y Cyt1Aa contra larvas del 4º. estadio de *Ae. aegypti* en comparación a lo que se observa con el cristal paraesporal completo de Bti, es significativamente menor. No obstante, usadas en combinación, estas proteínas generan un efecto sinérgico apreciable, que a proporciones muy bajas de Cyt1Aa, puede llegar a ser 18 veces superior al efecto teórico esperando de la suma de sus actividades individuales (tabla 10).

## **6.2 Unión secuencial de Cry11Aa y Cyt1Aa en VMMA de *Ae aegypti*.**

Una vez analizado el efecto sinérgico entre Cry11Aa y Cyt1Aa contra larvas del 4º. estadio de *Ae. aegypti*, se procedió a realizar los ensayos para sustentar un posible mecanismo molecular de sinergismo entre dichas toxinas.

Reportes previos demostraron que Cyt1Aa y Cry11Aa se unen a la membrana apical del intestino del mosquito *Anopheles gambiae* a través de la misma región (Ravoanhangimalala *et al.*, 1995). También se demostró que la toxina Cry11Aa se une específicamente a su receptor en VMMA de *Ae. aegypti* (Buzdin *et al.*, 2002; Krieger *et al.*, 1999) a través de una proteína tipo ALP anclada a membrana por un grupo GPI (Fernández *et al.*, 2006). En contraste, Cyt1Aa no se une a receptores proteínicos, sino que interactúa directamente con fosfolípidos insaturados de membrana tipo estearilamina, abundantes en células intestinales de dípteros (Drobniewski y Ellar 1988; Promdonkoy *et al.*, 2000). Pero ¿qué pasa con el patrón de unión de Cry11Aa y Cyt1Aa en el intestino de *Ae. aegypti* cuando ambas proteínas están presentes en el ensayo? ¿Cyt1Aa, al tener un patrón de unión tan inespecífico, podría inhibir o por el contrario, favorecer la unión de la toxina Cry11Aa? Para responder esta pregunta se decidió hacer un ensayo de unión secuencial con la finalidad de observar si el pegado de la toxina Cyt1Aa en la membrana afecta la unión de Cry11Aa.

Para la realización de dicho ensayo se procedió a purificar las proteínas de interés haciendo uso de las cepas de Bt que producen las  $\delta$ -endotoxinas Cry11Aa (Bt CG6 pWF26) y Cyt1Aa (Bt 4Q7 pWF45). Se favoreció su esporulación y la producción de cristales inoculando las cepas en medio mínimo SP, que contiene sales minerales como MgSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>, KCl, FeSO<sub>4</sub> y CaCl<sub>2</sub>. Posteriormente los cristales se purificaron por

gradiente de sacarosa (Thomas y Ellar, 1983b), se solubilizaron y finalmente se activaron proteolíticamente para obtener el fragmento tóxico o toxina. Las condiciones de solubilización y activación de Cry11Aa y Cyt1Aa se resumen en las tablas 11 y 12.

TOXINA	BUFFER	TEMPERATURA	TIEMPO
Cry11Aa	NaOH 100 mM	4°C	1 h
Cyt1Aa	Carbonatos 50 mM + 10 mM DTT	37°C	1 h

Tabla 11. Condiciones de solubilización para los cristales de Cry11Aa y Cyt1Aa

En el caso de la proteína Cry11Aa, el procesamiento con tripsina genera un corte intramolecular en la arginina 326 lo que genera la producción de dos polipéptidos de 36 y 32 kDa (figura 19), que se mantienen asociados por interacciones hidrofóbicas y puentes salinos. Ambos fragmentos son necesarios para la actividad tóxica de Cry11Aa (Dai y Gill, 1993; Yamagiwa *et al.*, 2002; Yamagiwa *et al.*, 2004).

TOXINA	PROPORCIÓN (enzima:proteína)	TEMPERATURA	TIEMPO	ENZIMA
Cry11Aa	1:50	25°C	2 h	Tripsina
Cyt1Aa	1:30	30°C	1 h	Proteinasa K

Tabla 12. Condiciones de procesamiento proteolítico para Cry11A y Cyt1A.

Por su parte, la toxina Cyt1Aa puede activarse con tripsina en una relación de 1:50, enzima:proteína, a 37°C durante 30', sin embargo, dicho procesamiento es parcial, pues sólo se obtiene un corte en la región N-terminal, lo cual, no basta para su completa activación. Por ello, es recomendable trabajar con proteinasa K, que corta tanto el extremo amino como el carboxilo (Said *et al.*, 1995) y genera la formación del fragmento activo de 23 kDa (Figura 19).

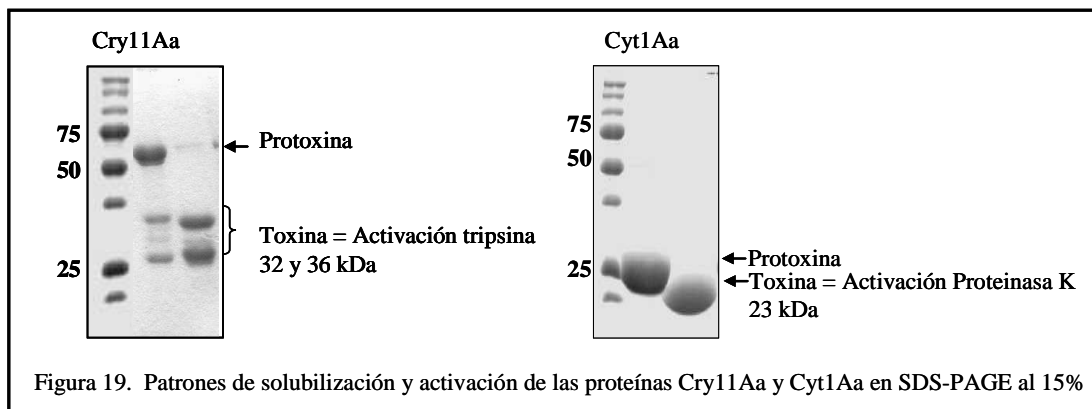


Figura 19. Patrones de solubilización y activación de las proteínas Cry11Aa y Cyt1Aa en SDS-PAGE al 15%

Una vez con las toxinas activadas, se procedió a realizar el ensayo de unión secuencial. El propósito de este ensayo, como se mencionó anteriormente, fue evaluar el posible efecto que la toxina Cyt1Aa tiene sobre la unión de Cry11Aa en VMMA de *Ae. aegypti*. El experimento consistió en preincubar 10 µg de VMMA de *Ae. aegypti* s con 5 nM de toxina Cyt1Aa por 1 h. La toxina no unida se removió con 3 lavados con PBS 1X y centrifugación, para posteriormente evaluar el patrón de unión de 5 nM de Cry11Aa biotinilada sobre dichas membranas. En el caso de las VMMA preincubadas con Cyt1Aa sin marca, se observó que la unión de Cry11Aa biotinilada incrementó notablemente en comparación con las VMMA sin preincubar (Figura 20A). Este efecto fue más apreciable al realizar ensayos de competencias homólogas en los cuales se evaluó la habilidad de Cry11Aa no marcada para desplazar la señal de Cry11Aa biotinilada en VMMA (Figura 20B). Este experimento muestra que es más difícil desplazar la señal de Cry11Aa biotinilada en VMMA preincubadas con Cyt1Aa, que en las no preincubadas, aun y cuando se ocupan 1000 y 10000 excesos nM de Cry11Aa no marcada. Además, este ensayo también muestra que la unión de Cry11Aa a VMMA, aun en presencia de Cyt1Aa, es saturable como cuando la toxina no está presente, lo que sustenta un alto grado de especificidad en la unión. De hecho, pareciera que la presencia de Cyt1Aa proporciona más sitios de unión para Cry11Aa de los que naturalmente tiene en las VMMA de *Ae. aegypti*, lo cual, fue el primer indicio para apoyar la hipótesis de que Cyt1Aa puede funcionar como un receptor para Cry11Aa.

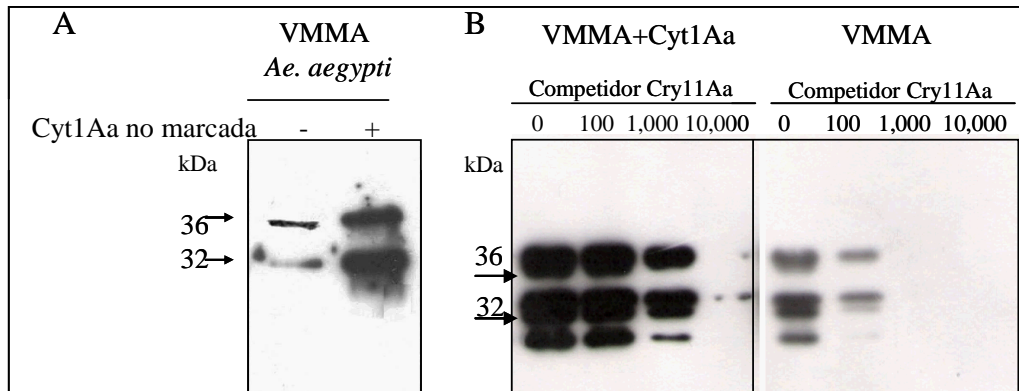
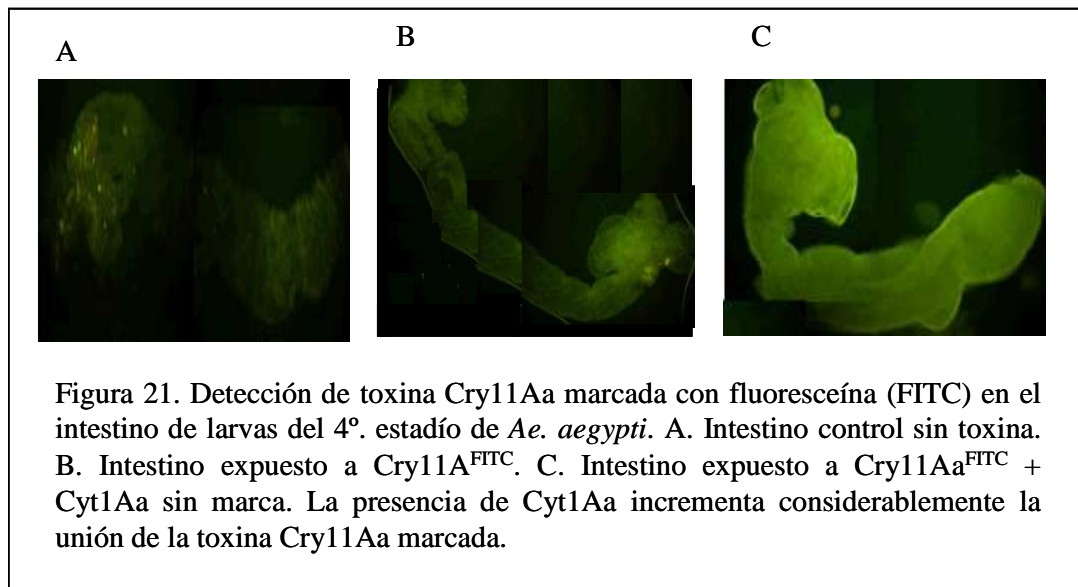


Figura 20. Análisis de unión secuencial de Cyt1Aa y Cry11Aa a VMMA de *Ae. aegypti*. (A) 5 µg de VMMA fueron preincubadas con 5 nM de Cyt1Aa sin marca, lavadas por centrifugación y usadas para evaluar la unión de 5 nM de Cry11Aa biotinilada. Cyt1Aa incrementa la unión de Cry11Aa biotinilada a VMMA de *Ae. aegypti*. (B) Competencias homólogas de unión de Cry11A biotinilada a VMMA de *Ae. aegypti* preincubadas y no preincubadas con 5 nM de Cyt1A fría. Se necesitan de altas concentraciones de toxina Cry11Aa sin marca para desplazar la señal de Cry11Aa biotinilada, por lo que se sugiere que las VMMA preincubadas con Cyt1Aa tienen más sitios de unión disponibles para Cry11A que las VMMA sin tratar.

Para sustentar aun más el hecho de que Cyt1Aa es capaz de favorecer la unión de Cry11Aa en el intestino de *Ae. aegypti*, se desarrolló un ensayo de interacción *in vivo*. En dicho experimento, se evaluó por microscopía de fluorescencia la localización de la toxina Cry11Aa marcada con fluoresceína (FITC) en el intestino de *Ae. aegypti*. El experimento consistió en alimentar a larvas del 4o. estadio de *Ae. aegypti* con una dosis de 400 ng/ml de la toxina marcada por un lapso no mayor a 2 h. Posteriormente se extrajo el intestino y se visualizó el patrón de fluorescencia que mostró. El intestino disectado que estuvo en contacto con Cry11Aa<sup>FITC</sup>, mostró señal de fluorescencia en la zona anterior (cæca) y posterior del intestino (Figura 21B), en comparación con el intestino control en ausencia de toxina que no mostró señal de fluorescencia (Figura 21A).



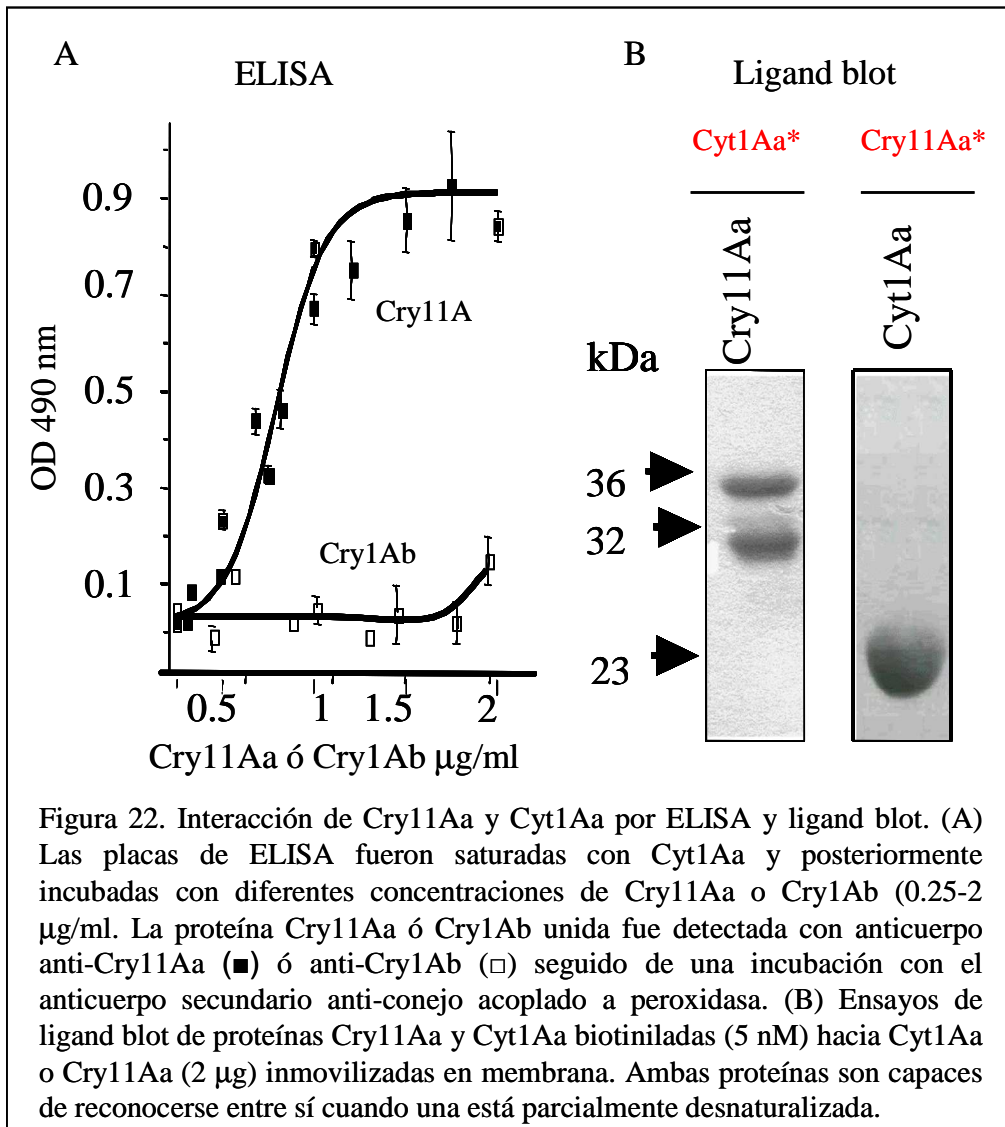
Para observar el efecto de la presencia de Cyt1Aa en la unión de Cry11Aa<sup>FITC</sup>, nuevamente se alimentaron larvas con ambas toxinas (Cry11Aa marcada y Cyt1Aa fría) en dosis equimoleculares (400 ng/ml). Se observó que la señal de fluorescencia incrementó notablemente en presencia de Cyt1Aa, localizándose a todo lo largo del intestino (Figura 21C), por lo que podemos concluir que la toxina Cyt1Aa sí favorece la unión de Cry11Aa al intestino de *Ae. aegypti*, lo cual no sólo correlaciona con el ensayo de unión secuencial *in vitro* (Figura 20), sino que refuerza la idea de que Cyt1Aa es capaz de brindarle sitios extras de unión a Cry11Aa, incluso, favoreciendo la unión de dicha toxina en regiones donde naturalmente, no se localiza.

### **6.3 Interacción de las proteínas Cry11Aa y Cyt1Aa en solución y en presencia de VMMA de *Ae aegypti*.**

Para determinar si el incremento de unión de Cry11Aa en VMMA de *Ae. aegypti* preincubadas con Cyt1Aa involucra la interacción física entre ambas proteínas, se emplearon tres diferentes técnicas: 1) ELISA 2) ensayo de unión a ligado ó ligand blot y 3) coimmunoprecipitación. Los dos primeros ensayos involucran la evaluación de la interacción entre las proteínas en solución, mientras que el tercero comprende un análisis del mismo efecto tanto en solución como en presencia de VMMA de *Ae. aegypti*.

En el caso del ensayo tipo ELISA, se evaluó la habilidad que tienen las proteínas Cry11Aa y Cyt1Aa de interactuar cuando ambas se encuentran en solución. Para esto se fijaron en placa 5 µg/ml de toxina Cyt1Aa y posteriormente se evaluó la unión de concentraciones crecientes de Cry11Aa (0.25 – 2.0 µg/ml). La señal se reveló mediante la adición de ortofenildiamina (OPD) a  $\lambda$  de 490 nm. En la figura 22A, se observa que a medida que se iba incrementando la concentración de Cry11Aa en el ensayo, la señal obtenida también aumenta hasta llegar a un punto máximo de saturación, en contraste con Cry1Ab (toxina específica para insectos lepidópteros), la cual no mostró unión con Cyt1Aa a esas mismas concentraciones. Lo anterior demuestra que ambas toxinas son capaces de interactuar entre sí de forma específica en solución.

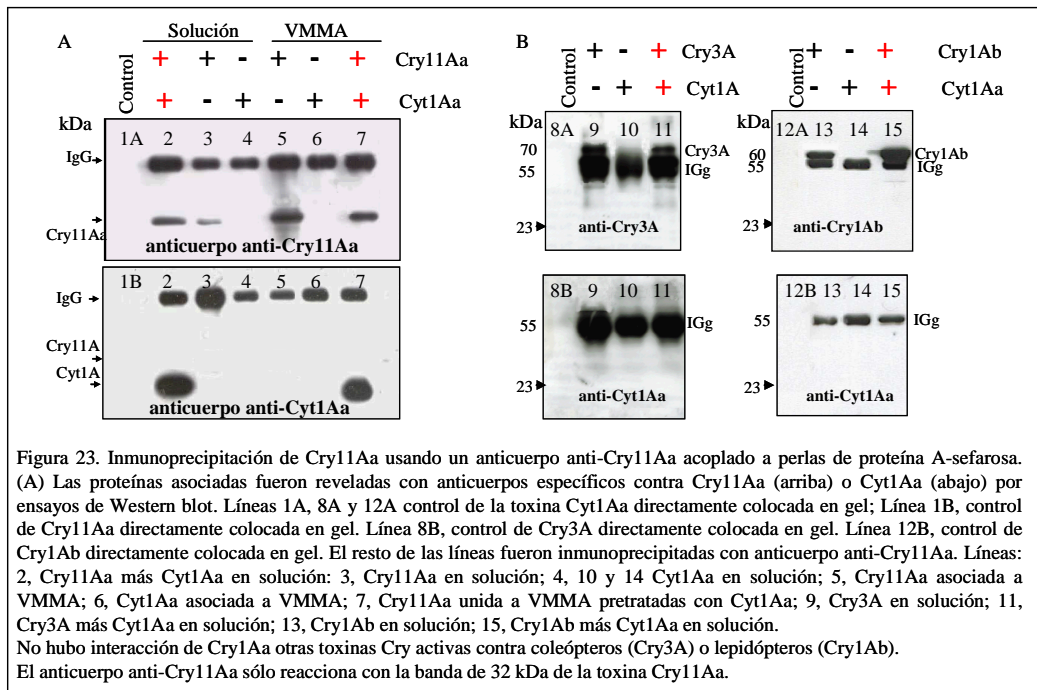
Por su parte, el ensayo tipo ligand blot demostró que la toxina Cry11Aa biotinilada es capaz de unirse a la proteína Cyt1Aa fija en membrana y viceversa (Fig. 22B). El experimento consistió en colocar 2 µg de las toxinas Cry11Aa y Cyt1Aa en un gel de SDS-PAGE al 12%. Posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana de PDVF y se evaluó la habilidad de las toxinas Cyt1Aa y Cry11Aa biotiniladas (5 nM) para interactuar con las proteínas inmovilizadas. La toxina que no se unió se lavó y la unida se detectó con estreptavidina acoplada a peroxidasa (SAPO) haciendo uso de reactivos de quimioluminiscencia. Se observó que la toxina Cry11Aa biotinilada es capaz de unirse a la toxina Cyt1Aa parcialmente desnaturizada y viceversa. Esto podría implicar que el sitio de reconocimiento entre Cry11Aa y Cyt1Aa es un epítipo pequeño y expuesto a solvente.



Finalmente, por ensayos de co-immunoprecipitación se demostró que la toxina Cyt1Aa puede interactuar con Cry11Aa en solución y también cuando ya ha sido previamente incubada con VMMA de *Ae. aegypti*. Este experimento mostró que la toxina Cry11Aa es capaz de inmunoprecipitar gracias al anticuerpo anti-Cry11Aa asociado a perlas de proteína A-sefarosa y llevarse consigo a la proteína Cyt1Aa. Lo anterior se evaluó sometiendo a la muestra precipitada a un gel SDS-PAGE al 12% y analizando la presencia de las proteínas Cry11Aa y Cyt1Aa por Western blot usando



anticuerpos específicos para cada una de las toxinas. La Figura 23 muestra que Cry11Aa y Cyt1Aa están presentes el inmunoprecipitado cuando estas dos toxinas fueron incubadas tanto en solución (línea 2) como cuando Cyt1Aa fue previamente incorporada a VMMA (línea 7). El control negativo muestra que Cyt1Aa sólo coprecipita con las perlas en presencia de Cry11Aa (líneas 4 y 6). Además, realizando el mismo ensayo pero con otras toxinas Cry específicas hacia coleópteros y lepidópteros, y usando anticuerpos específicos para dichas proteínas acoplados a perlas de proteína A-sefarosa, se confirmó que Cyt1Aa no interacciona con Cry3A (línea 11) ni con Cry1Ab (línea 15) por lo tanto, existe una especificidad en la interacción entre Cry11Aa y Cyt1Aa, ya que Cyt no fue capaz de coprecipitar con otras toxinas Cry.

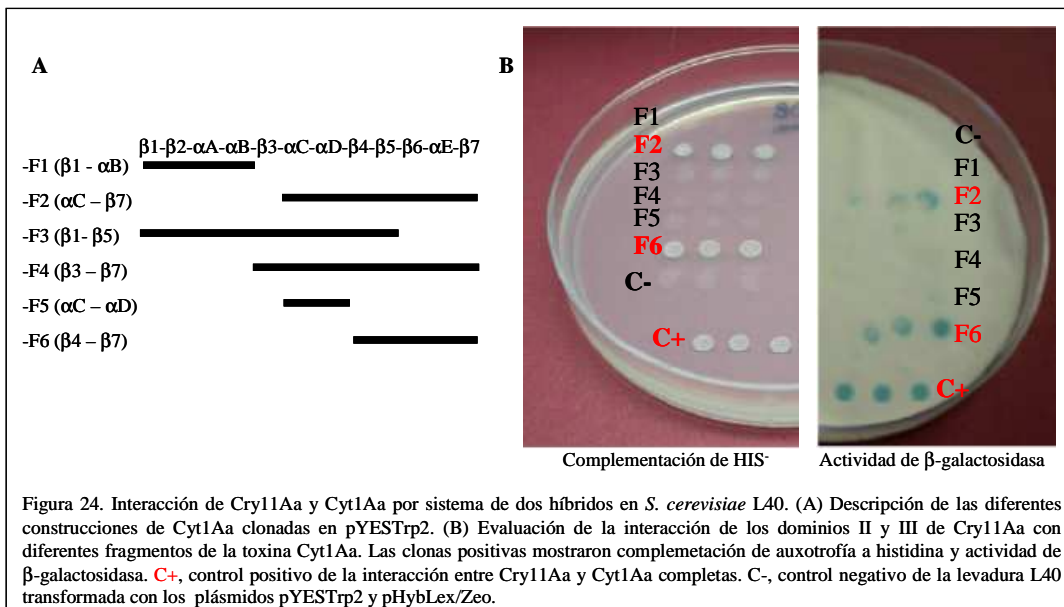


#### 6.4 Identificación de epítopes de unión entre Cry11Aa y Cyt1Aa.

A partir de los resultados anteriores, nosotros hipotetizamos que Cyt1Aa y Cry11Aa interactúan a través de epítopes específicos y que dicha interacción es importante para el efecto de sinergismo entre estas dos toxinas. Como un primer acercamiento para identificar las regiones involucradas en la interacción, se realizó la técnica de sistema de dos híbridos en levadura (Tsiokas *et al.*, 1997). La secuencia completa del gen de *cry11Aa* y los dominios de unión II y III fueron fusionados con el dominio de unión a DNA LexA y clonados en el plásmido anzuelo pHybLex/Zeo,

mientras que la secuencia completa del gen de *cyt1Aa* y diferentes fragmentos de la misma proteína fueron fusionados al dominio de activación B42 y clonados en el plásmido presa pYESTrp2.

La construcción de Cry11Aa al ser cotransformada junto con la construcción de Cyt1Aa en la levadura L40 mostró interacción positiva (Figura 24B), lo cual se comprobó con el crecimiento de la cepa en medio SC sin el marcador autotrófico histidina (complementación de auxotrofia) y la expresión de actividad  $\beta$ -galactosidasa. Para delimitar la región de interacción de Cyt1Aa involucrada en la unión con Cry11Aa, seis fragmentos sobrelapantes de Cyt1Aa (Figura 24A) fueron fusionados al dominio de activación B42 y probados en su interacción con el dominio II y III de Cry11Aa. Una vez hecho lo anterior, se observó que sólo los fragmentos F2 y F6 interactuaron con los dominios II y III de Cry11Aa (Fig. 24B). Estos dos fragmentos involucran 105 residuos en el extremo C-terminal que comprenden de la región  $\beta$ 4 a  $\beta$ 7 de la toxina Cyt1Aa. No obstante, resulta interesante ver que la construcción F4 de Cyt1Aa no muestra interacción positiva con los dominios II y III de Cry11Aa, pese a contener la región  $\beta$ 4 a  $\beta$ 7 de la toxina Cyt1Aa. Esto podría deberse a que en dicha construcción la proteína Cyt1Aa presentó problemas de plegamiento que bloquearon su sitio de interacción con Cry11Aa. Por lo tanto, se puede concluir que para observarse interacción entre estas proteínas se requiere que los sitios de unión estén expuestos a solvente y con su estructura secundaria lo más conservada posible.



Debido a que la región de interacción identificada en Cyt1Aa gracias al sistema de dos híbridos es aún grande, se decidió delimitarla más haciendo uso de una librería de péptidos sobrelapantes inmovilizados en membrana de nitrocelulosa por síntesis SPOT. Estos péptidos involucran de la hélice  $\alpha$ C hasta la lámina  $\beta$ 7 de Cyt1Aa, resultando en 31 péptidos de 15 aminoácidos cada uno (por lo que 12 aminoácidos siempre sobrelapan con el péptido anterior) los cuales fueron evaluados en su capacidad para interactuar con Cry11Aa biotinilada. La Figura 25 (panel A y B) muestra que la interacción involucra las secuencias  $^{196}\text{EIKVSAVKE}^{204}$  (spots 16–20) y  $^{220}\text{NIQSLKFAQ}^{228}$  (spots 23–26). Estas dos regiones fueron localizadas en un modelo que simula la estructura tridimensional de la proteína Cyt1Aa (Figura 25C), el cual fue obtenido por comparación con la estructura de la toxina Cyt2Aa1 (Li *et al.*, 1996). La secuencia  $^{196}\text{EIKVSAVKE}^{204}$  está localizada en una región altamente expuesta que conecta a la lámina  $\beta$ 6 con la hélice  $\alpha$ E, mientras que la secuencia  $^{220}\text{NIQSLKFAQ}^{228}$  esta localizada en una región expuesta de la lámina  $\beta$ 7. Ambas regiones se encuentran cercanas una de la otra en la estructura tridimensional (Figura 25C).

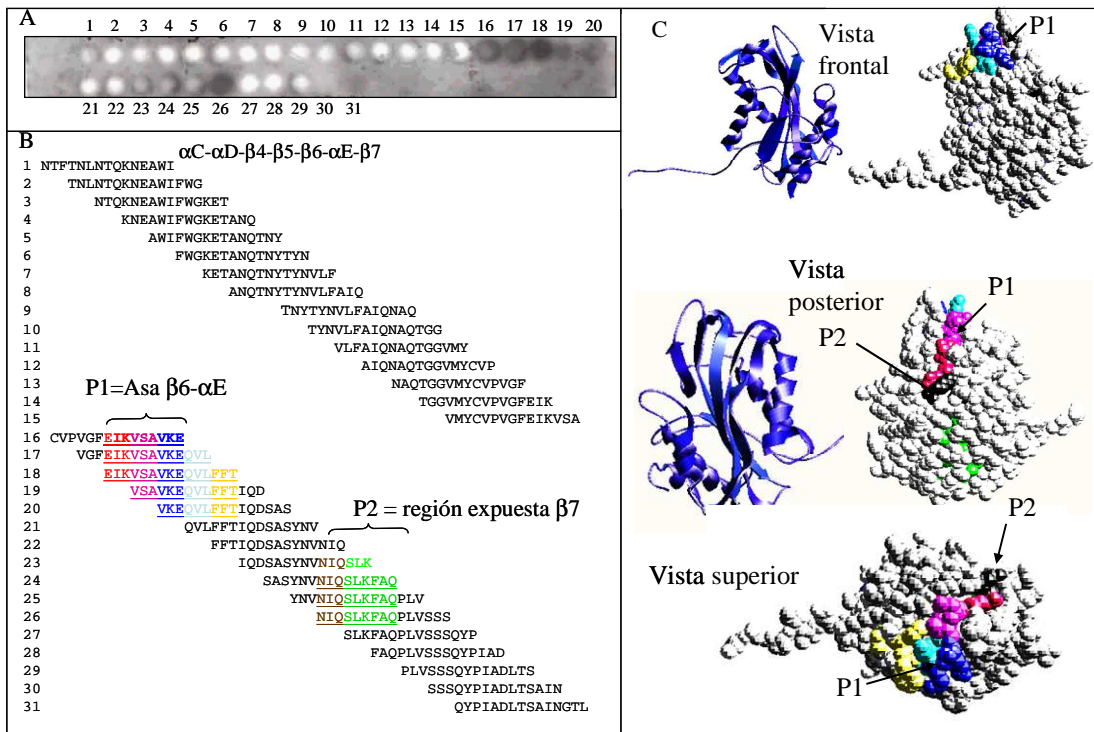


Figura 25. Identificación de la región mínima de interacción de Cyt1Aa involucrada en la interacción con Cry11Aa. (A) Péptidos sobrelapantes inmovilizados en membrana por síntesis SPOT que abarcan de la región  $\alpha$ C a  $\beta$ 7 de Cyt1Aa fueron analizados en su interacción con Cry11Aa biotinilada. (B) Descripción de los péptidos sobrelapantes de Cyt1Aa que unen a Cry11Aa. (C) Localización de las dos regiones de interacción (EIKVSAVKE y NIQSLKFAQ) identificadas en la estructura de la toxina Cyt2Aa1. Los residuos NIQ están dibujados en negro para efectos de calidad de la imagen.

Para determinar la importancia de los residuos identificados anteriormente en Cyt1Aa en la interacción con Cry11Aa, se realizaron ensayos de competencia usando péptidos sintéticos que corresponden al asa que une  $\beta 6$ - $\alpha E$  y la región expuesta sobre  $\beta 7$  (Tabla 13), los cuales se ocuparon en experimentos de competencias heterólogas por ELISA (Figura 26A) y ligand blot (Figura 26B).

Nombre	Secuencia	Descripción
Asa $\beta 6$ - $\alpha E$	EIKVSAVKE	Secuencia de los aminoácidos 196–204 en Cyt1Aa
$\beta 7$	NIQSLKFAQ	Secuencia de los aminoácidos 220–228 en Cyt1Aa

Tabla 13. Secuencias de péptidos sintéticos en Cyt1Aa.

Ambos péptidos compiten la interacción de Cyt1Aa con Cry11Aa. Un péptido que presenta la misma composición de aminoácidos pero orden distinto (scramble), fue usado a una alta concentración (100 mM) a manera de control para demostrar la especificidad del ensayo.

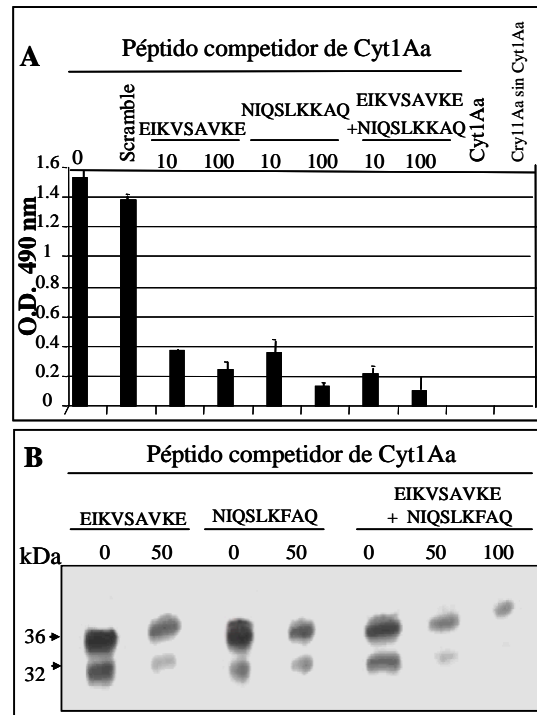


Figura 26. Ensayos de competencias en la interacción de Cry11Aa y Cyt1Aa usando péptidos de las regiones  $\beta 6$ - $\alpha E$  y  $\beta 7$  de Cyt1Aa. (A) Análisis de la inhibición de la interacción entre Cry11Aa y Cyt1Aa por ELISA en presencia o ausencia de 10-100 excesos mM de los péptidos sintéticos EIKVSAVKE y NIQSLKKAQ. Como control negativo se ocupó un péptido “scramble” a un exceso de 100 mM. Las placas de ELISA fueron saturadas con 5  $\mu$ g/ml de Cyt1Aa, bloqueadas con leche al 5% en PBS 1x, Tween 20 0.1% e incubadas con 0.8  $\mu$ g/ml de Cry11Aa. (B) Ensayo de ligand blot para evaluar la unión de 5 nM de la toxina Cyt1Aa biotinilada a 2  $\mu$ g de la proteína Cry11Aa inmovilizadas en membrana de nitrocelulosa. Los péptidos sintéticos fueron ocupados en excesos de 50 y 100 mM.

Las regiones expuestas del dominio II en las toxinas Cry son importantes para la unión con el receptor (Lee *et al.*, 1996). Concretamente, en la toxina Cry11Aa se sabe que el asa  $\alpha 8$  es fundamental para su interacción con el receptor ALP (Fernández *et al.*, 2005). Por ello, para identificar los epítomos de interacción de Cry11Aa involucrados en su interacción con Cyt1Aa, se desarrollaron ensayos de competencias heterólogas ocupando péptidos sintéticos que corresponden a las asas más expuestas del dominio II de Cry11Aa (Tabla 14).

Nombre	Secuencia	Descripción
Asa $\alpha 8$	GVSIPVNYNEWG	Secuencia de los aminoácidos 257–268 en Cry11Aa
Asa 1	DIPARENIRGVH	Secuencia de los aminoácidos 298–309 en Cry11Aa
$\beta 4$	GNGRTNNFNFADNN	Secuencia de los aminoácidos 323–336 en Cry11Aa
$\beta 5$	TFYQNPNEPIAPR	Secuencia de los aminoácidos 347–360 en Cry11Aa
$\beta 6$	APAPADLFFKNADI	Secuencia de los aminoácidos 369–382 en Cry11Aa
Asa 2	FTQWFQSTLYG	Secuencia de los aminoácidos 386–396 en Cry11Aa
Asa 3	LTYNRIEYDSPTTEN	Secuencia de los aminoácidos 447–461 en Cry11Aa

Tabla 14. Secuencias de péptidos sintéticos de las regiones más expuestas del dominio II de Cry11Aa.

Se observó que los péptidos sintéticos que corresponden al asa  $\alpha 8$ , el asa 2 y la región  $\beta 4$  compiten la interacción entre Cry11Aa y Cyt1Aa por ensayos tipo ELISA (Figura 27A) y ligand blot (Figura 27B), en contraste con el asa 1, el asa 3 y la región en  $\beta 6$  que no inhiben la interacción por ninguna de los dos ensayos, sugiriendo que en el dominio II de Cry11Aa las regiones importantes en la interacción con Cyt1Aa serían el asa  $\alpha 8$ , el asa 2 y la  $\beta 4$ . Este dato es muy importante, porque al menos una de estas regiones (asa  $\alpha 8$ ) está involucrada también en la unión a ALP, por lo que la idea de que Cyt pueda funcionar como un posible receptor cobra mayor importancia.

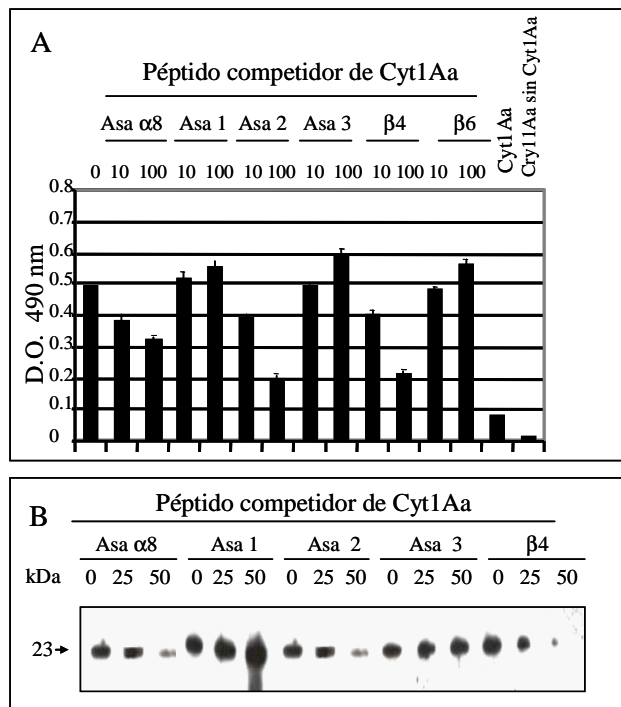


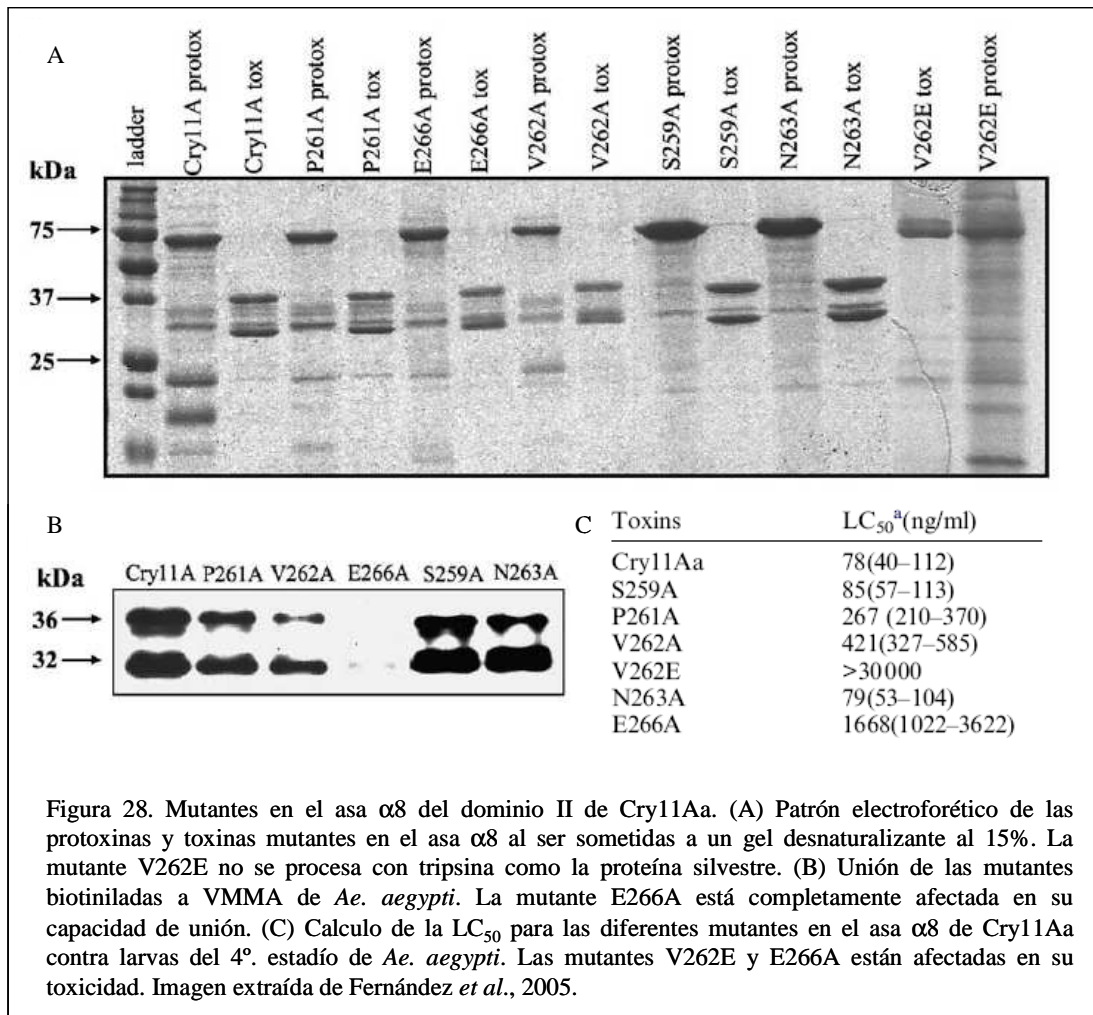
Figura 27. Ensayos de competencias en la interacción de Cyt1Aa y Cry11Aa usando péptidos de las regiones más expuestas en el dominio II de la toxina Cry11Aa. (A) Análisis de la inhibición de la interacción entre Cry11Aa y Cyt1Aa por ELISA en presencia o ausencia de 10-100 excesos mM de los péptidos sintéticos. (B) Ensayo de ligand blot para evaluar la unión de 5 nM de la toxina Cry11Aa biotinilada a 2 µg de la proteína Cyt1Aa inmovilizadas en membrana de nitrocelulosa. Los péptidos sintéticos fueron ocupados en excesos de 25 y 50 mM.

### 6.5 Análisis de la importancia en la interacción de Cry11Aa y Cyt1Aa sobre el proceso de sinergismo *in vivo*.

Para validar que las regiones de interacción entre Cry11Aa y Cyt1Aa identificadas en el apartado anterior tienen una importancia en el sinergismo *in vivo*, se desarrolló mutagénesis sitio-dirigida en los epítopes de interacción entre Cry11Aa y en Cyt1Aa, para posteriormente analizar el sinergismo y la interacción entre dichas mutantes.

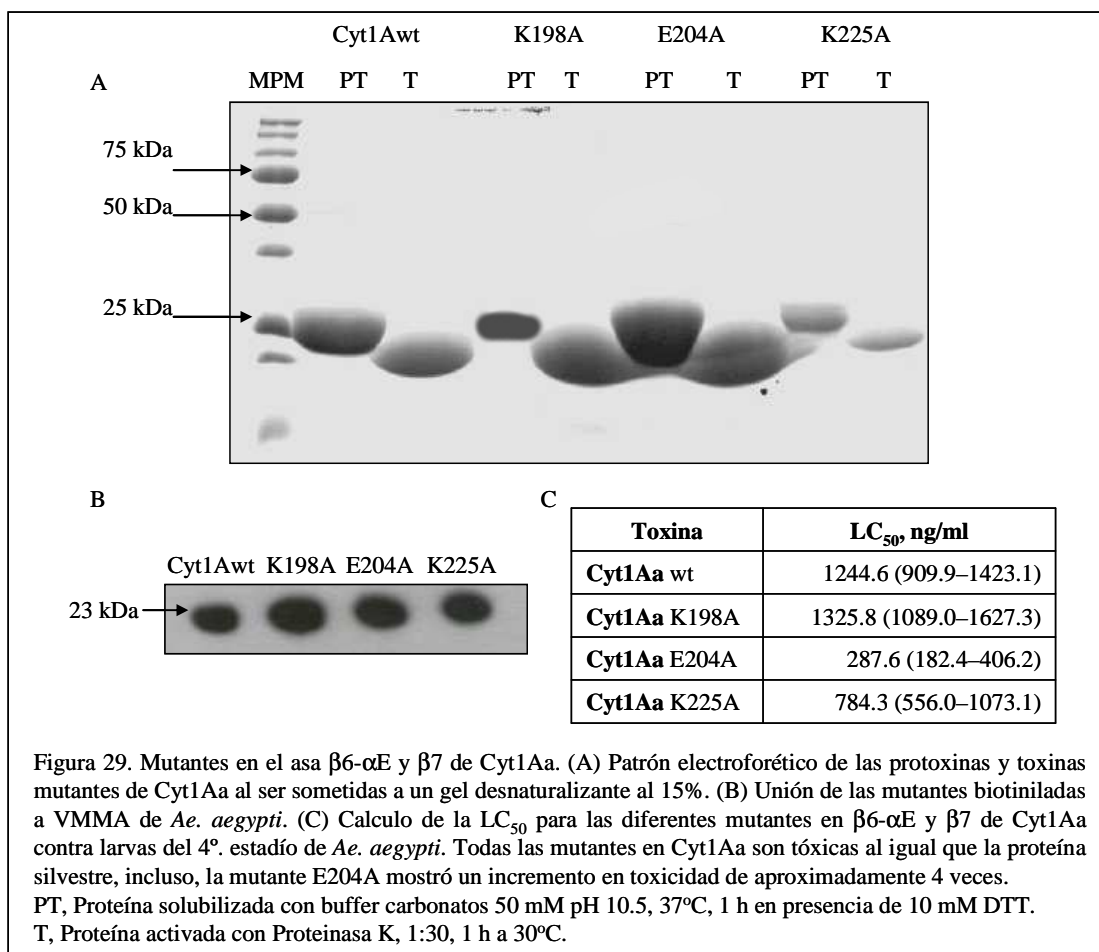
En el caso de Cry11Aa se decidió comenzar la mutagénesis en el asa  $\alpha$ 8 del dominio II (<sup>257</sup>GVSIPVNYNEWG<sup>268</sup>), esto debido a que esta región está involucrada en la unión de la toxina con ALP (Fernández *et al.*, 2005). Las mutantes obtenidas en dicha asa (Figura 28) fueron amablemente proporcionadas por la Dra. Luisa Elena Fernández y todas mostraron un patrón de solubilización y activación similar al de la

cepa silvestre, a excepción de la mutante V262E que no pudo ser procesada (Figura 28A). En cuanto a su capacidad de unión a VMMA de *Ae. aegypti* y toxicidad contra estas mismas larvas de mosquitos, tres mutantes en el asa  $\alpha 8$  de Cry11Aa (P261A, V262A y E266A) mostraron estar afectadas en su unión a VMMA (Figura 28B) y ser 3, 5 y 20 veces menos tóxicas que la cepa silvestre hacia larvas de *Ae. aegypti* (Figura 28C), mientras que otras dos mutantes en Cry11Aa, S259A y N263A, mostraron una unión a VMMA y toxicidad similar al de la cepa silvestre (Figura 28B y C) (Fernández *et al.*, 2005).



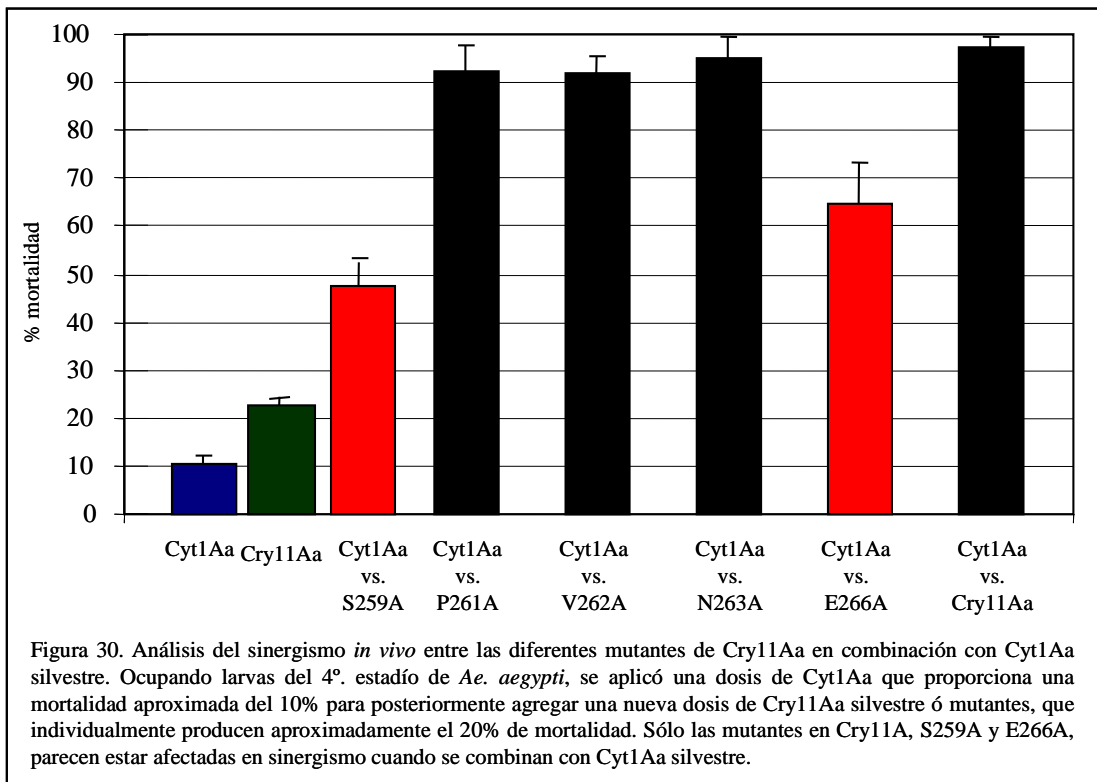
Por otro lado, se obtuvieron mutantes en el asa  $\beta 6$ - $\alpha E$  y  $\beta 7$  de Cyt1Aa, de las cuales, ninguna mostró efectos adversos en cuanto a toxicidad, solubilización, activación proteolítica o unión a VMMA de larvas de *Ae. aegypti* (Figura 29).





Una vez con las proteínas mutantes tanto en Cry11Aa como en Cyt1Aa se procedió a evaluar el sinergismo *in vivo* de las diferentes combinaciones de proteínas. Bioensayos preliminares en presencia de una dosis subletal de Cyt1Aa silvestre que mata el 10% de la población, demostraron que sólo las mutantes E266A y S259A en Cry11Aa tienen un efecto negativo sobre el fenómeno de sinergismo (Figura 30). Por ello, se decidió realizar el cálculo del FS y los respectivos bioensayos en combinación con las mutantes de Cyt1Aa, sólo con las éstas mutantes de Cry11Aa, pues son las que muestran un efecto apreciable en disminución de actividad tóxica en combinación con Cyt1Aa silvestre.





Como se mencionó el apartado 6.1, el factor de sinergismo (FS) de la combinación de las proteínas silvestres varío en dependencia de la proporción usada para cada combinación. El máximo valor de SF encontrado para Cry11Aa y Cyt1Aa fue de 18 a una relación de 0.2:1 Cyt:Cry (Tabla 15), en contraste con valores de 8.3 para una relación 0.5:1 ó 3.5 para una relación de 1:1 (Tabla 10). Por ello se decidió que la proporción ideal para llevar a cabo el análisis de las diferentes combinaciones de proteínas mutantes y silvestres se realizaría a una proporción de 0.2:1 Cyt:Cry respectivamente.

Mezclando a las mutantes de Cry11A S259A y E266A a un radio de 0.2:1 con Cyt1A silvestre se obtuvieron factores de sinergismo menores que los encontrados con Cry11A silvestre (2.5 y 2.3, respectivamente). Lo mismo se observó con la mezcla de las mutantes de Cyt1A E204A ó K226A cuando se analizaron en combinación con Cry11Awt, indicando que estas mutaciones afectaron la actividad sinérgica de dichas proteínas. Además, la mezcla de dos proteínas mutantes como Cyt1A-K225A y

Cry11A-S259A resultó en una toxicidad muy baja y en nulo sinergismo (Tabla 15 y Figura 31). No obstante, de forma interesante la mutante K198A en el asa  $\beta 6$ - $\alpha E$  mostró un incremento en sinergismo dos veces mayor de lo que se observó con la proteína Cyt1A silvestre (Tabla 15 y Figura 31), por lo que podemos concluir que esas regiones de interacción son importantes y pueden involucrar tanto disminución como mejoramiento del efecto sinérgico.

Combinación de toxinas	LC <sub>50</sub> (ng/ml)	LC <sub>50</sub> (ng/ml)	SF <sup>a</sup>	K <sub>d</sub> <sup>b</sup>
	Teórica	experimental		
Cry11Aawt :Cyt1Aawt	227.3	12.1 (0.4-30.8) <sup>c</sup>	18.5	0.4
Cry11Aawt:Cyt-K198A	227.8	5.7 (0.3-14.2)	40.0	0.3
Cry11Aawt:Cyt-E204A	202.6	25.8 (11.4- 42.0)	7.9	1.5
Cry11Aawt:Cyt-K225A	222.5	66.4 (42.3-111.4)	3.4	4.0
Cry11-E266A :Cyt1Aawt	650.3	286.0 (164.9-521.7)	2.3	1.2
Cry11-S259A :Cyt1Aawt	179.0	70.9 (35.6-119.4)	2.5	4.0
Cry11-S259A :Cyt1-K225A	176.5	445.9 (375.9-515.9)	0.4	30.0

Tabla 15. Factor de sinergismo y constante de disociación aparente para las diferentes mezclas de las proteínas Cry11Aa y Cyt1Aa a un radio de 1:0.2.

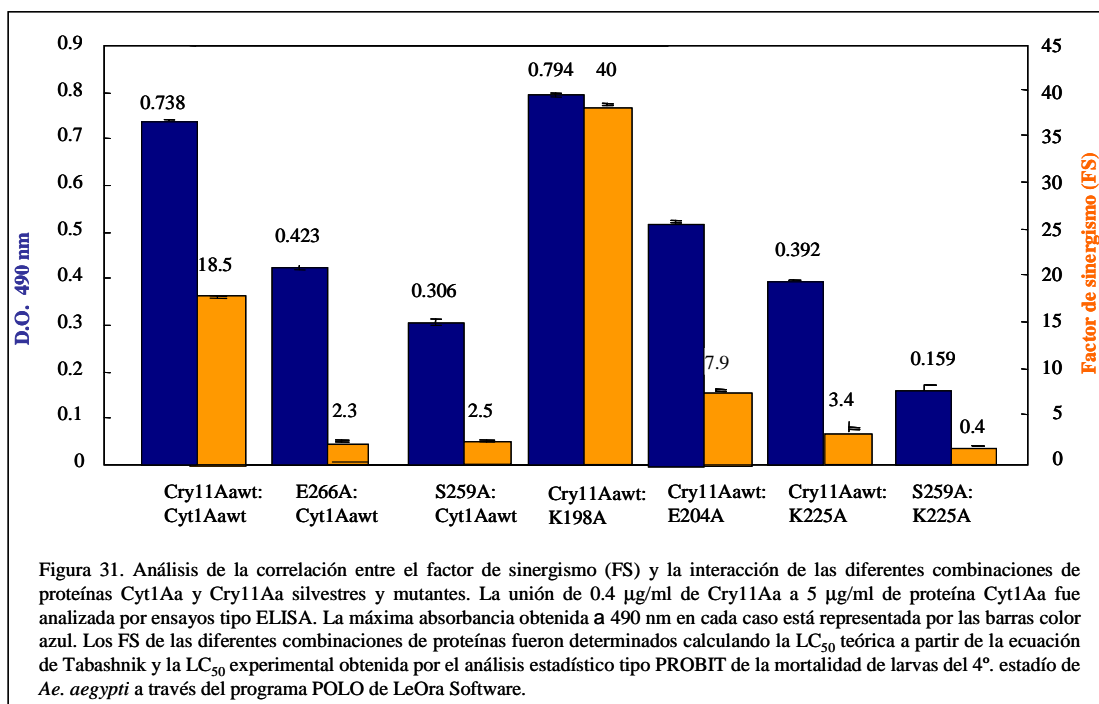
<sup>a</sup>Factor de sinergismo (LC<sub>50</sub> teórica/LC<sub>50</sub> experimental)

<sup>b</sup>Constante de disociación aparente obtenida por ensayos de ELISA competitiva.

<sup>c</sup> límites de confianza.

Para poder determinar si el incremento o decremento en sinergismo que mostraron las diferentes mezclas de proteínas mutantes y silvestres estaba directamente relacionado con el aumento o disminución en su capacidad de interacción, se realizaron ensayos de ELISA. La Figura 31 muestra que la interacción entre las proteínas correlaciona con el valor del FS de las diferentes combinaciones de Cyt1Aa-Cry11Aa. Concretamente, en el caso de la mutante en Cyt1Aa K198A, que mostró alto sinergismo por bioensayo, también se observó una elevada capacidad de interaccionar con Cry11Aa silvestre. Por su parte, las otra dos mutantes en Cyt E204A y K225A, mostraron el efecto contrario: reducida capacidad de unión a Cry11Aa, junto a un reducido

sinergismo. En cuanto a las mutantes en Cry11Aa, tanto S259A como E266A se unen menos a Cyt1Aa en comparación a como lo hace Cry11Aawt, mientras que la unión de dos mutantes afectadas en FS (Cyt1A-K225A y Cry11A-S259A) generó la respuesta más severamente afectada en cuanto a interacción.



Con el fin de establecer un resultado cuantitativo en cuanto a la afinidad existente entre las diferentes proteínas, se realizaron ensayos de ELISA competitiva. Dichos ensayos consistieron en incubar 10 nM de toxina Cyt1Aawt ó mutantes con concentraciones crecientes de Cry11Aawt ó mutantes (0.1 nM a 1 µM). Posteriormente las mezclas de toxinas se transfieren a una placa de ELISA previamente saturada con 2.5 µg de Cyt1Aawt y la toxina Cry11Aawt o mutantes que no interaccionó en solución, se unirá a la placa para posteriormente ser revelada con anticuerpo anti-Cry11Aa. La diferencia de absorbancia obtenida a las diferentes concentraciones de Cry11Aa en dependencia de Cyt1Aa genera una curva cuyo punto medio corresponde a la constante de afinidad aparente *K<sub>d</sub>*.

La tabla 15 mostró que la mutante en Cry11Aa S259A se une a Cyt1Aa silvestre con una *K<sub>d</sub>* mayor, lo que significa que la afinidad entre las proteínas es 10 veces menor que con Cry11Aa silvestre, mientras que la mutante E266A mostró una reducción en la

afinidad de 3 veces. Además, las mutantes en Cyt1Aa E204A y K225A también mostraron una  $K_d$  3 y 10 veces mayor que la obtenida con Cyt1Aawt. En el caso de la mutante en Cyt1Aa K198A, se observó un ligero decremento en el valor de la  $K_d$ , lo que también involucraría mayor afinidad. La interacción de la mutante K225A en Cyt1Aa con la mutante S259A en Cry11Aa mostró un valor de  $K_d$  75 veces mayor que el obtenido con las dos proteínas silvestres (Tabla 15) lo que significa que son la combinación de proteínas más afectada en afinidad y por lo tanto, la de menor sinergismo. Estos datos muestran que el decremento en la afinidad entre las mutantes de Cry11Aa ó Cyt1Aa correlaciona con la pérdida de sinergismo observada a nivel bioensayos.

Los resultados mostrados hasta este punto se observan en el Apéndice I (página 116) y están publicados bajo la siguiente cita: **Pérez, C.**, Fernández, LE., Sun J., Folch, JL., Gill SS., Soberón, M. y Bravo, A. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrana-bound receptor. 2005. PNAS **102**(51):18303-18308.

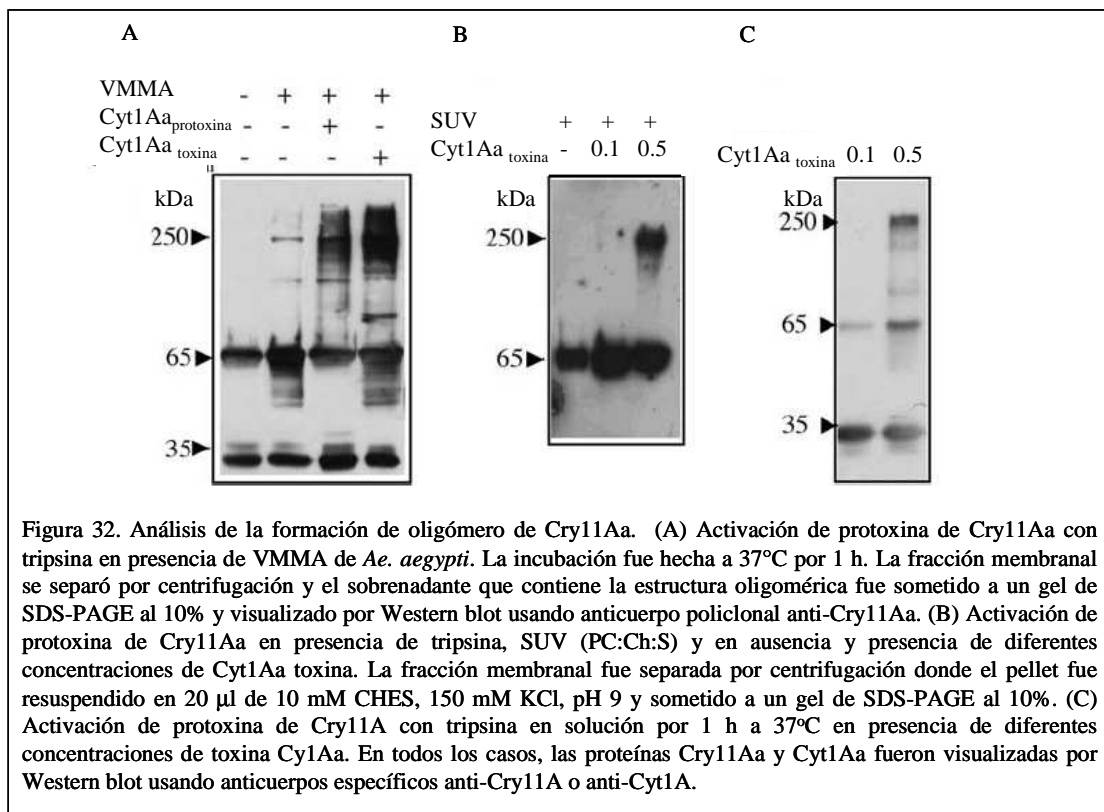
## **6.6 Análisis de la participación de Cyt1Aa en el proceso de oligomerización de Cry11Aa en solución y en presencia de membranas (VMMA de *Ae. aegypti* y SUV).**

Una vez fundamentada la importancia de la interacción física entre Cry11Aa y Cyt1Aa para la generación de sinergismo *in vivo*, se procedió a identificar si Cyt1Aa podría ser capaz de influir en uno de los pasos más determinantes en el mecanismo de acción general de las toxinas Cry: la formación de la estructura de pre-poro.

Las toxinas tipo Cry1A y Cry3A son capaces de formar oligómeros de 250 kDa cuando son activados en presencia de sus receptores localizados en las células de la microvellosidad apical del intestino medio (Gomez *et al.*, 2002b; Rausell *et al.*, 2004a; Muñoz-Garay *et al.*, 2006). Para determinar si Cry11Aa es capaz de formar oligómero como esas proteínas, se incubó a la protoxina en presencia de VMMA de *Ae. aegypti* colectadas sin utilizar inhibidores de proteasas, con el fin de que la proteína se active de forma natural y pueda interactuar con los receptores nativos que presenta la larva de mosquito (Fernández *et al.*, 2006). En la figura 32A, se muestra que Cry11Aa es capaz de formar una estructura de tipo oligomérico de aproximadamente 250 kDa cuando es

activada en presencia de VMMA de *Ae. aegypti*, y dicha estructura, es similar a la que se ha observado con otras toxinas Cry.

Por otro lado, dado que nosotros sabemos que Cry11Aa es capaz de interaccionar con la toxina Cyt1Aa, se analizó el efecto que esta segunda proteína puede tener sobre la formación de oligómero en Cry11Aa. Para esto se llevó a cabo un ensayo en el cual la protoxina soluble de Cry11Aa fue activada con tripsina en presencia de VMMA de *Ae. aegypti* y proteína Cyt1Aa en su forma de protoxina o toxina. La figura 32A muestra que ambas formas de Cyt1Aa incrementan significativamente el porcentaje de formación de oligómero de Cry11Aa, por lo que se sustenta la importancia de la participación de Cyt1Aa en esta etapa del mecanismo de acción molecular.



Para determinar si Cyt1Aa es capaz de inducir formación de oligómero de Cry11Aa en ausencia de proteínas adicionales provenientes de las VMMA, la protoxina soluble de Cry11Aa fue incubada con liposomas sintéticos (SUV) compuestos por una mezcla de fosfatidilcolina (PC), colesterol (Ch) y estearilamina (S) en una proporción 10:3:1 respectivamente, en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de

Cyt1Aa activada. La figura 32B, muestra que Cyt1Aa es capaz de inducir oligomerización de Cry11Aa cuando se usa en una proporción de 1:5 (Cyt1Aa:Cry11Aa w:w), lo que demostraría que el uso de Cyt1Aa es suficiente para facilitar la formación del oligómero de Cry11Aa. Es importante recalcar que dicha estructura oligomérica de 250 kDa no es capaz de detectarse ocupando un anticuerpo policlonal anti-Cyt1Aa, lo que sugiere que el oligómero de 250 kDa está compuesto sólo de Cry11Aa.

Finalmente se analizó si la toxina Cyt1Aa era capaz de inducir la oligomerización de Cry11Aa en ausencia de membranas. La figura 32C muestra que en efecto, Cyt1Aa es capaz de inducir la formación de una oligómero de Cry11Aa cuando la mezcla es tratada con tripsina. No obstante, el rendimiento parece ser menor.

### **6.7 Evaluación de la actividad formadora de poro del oligómero de Cry11Aa.**

Para determinar si la estructura de 250 kDa de Cry11Aa tiene actividad formadora de poro, se realizaron activaciones de Cry11Aa en presencia de tripsina, SUV y Cyt1Aa toxina como se describió en la figura 32B. Como proteínas control se ocuparon activaciones de Cry11Aa en ausencia de Cyt1Aa toxina ó toxina Cyt1Aa en ausencia de protoxina de Cry11Aa. Una vez con el oligómero formado se realizaron experimentos que permiten analizar permeabilidad a membrana por medio de cambios en fluorescencia. El primero de ellos es el ensayo de permeabilidad a ion  $K^+$ , en donde se miden los cambios en fluorescencia que sufre el colorante diS-C<sub>3</sub>-(5), el cual, es una cianina sensible a potencial de membrana. Aunque este ensayo es una medida indirecta del proceso de formación de poro, su estudio ha permitido analizar la actividad de las toxinas Cry1A activas contra insectos lepidópteros (Lorence *et al.*, 1995).

El experimento se llevó a cabo en 900  $\mu$ l de buffer 150 mM MeGluCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES pH 7.0, a 25°C con agitación constante. Posteriormente se adicionó el colorante (1.2  $\mu$ M), 10  $\mu$ g de SUV (cargados previamente con 150 mM KCl) y se esperó a que la señal del fluorímetro alcanzara el equilibrio (25''). Enseguida se agregaron 5  $\mu$ g del oligómero de Cry11Aa, lo que generó una hiperpolarización desencadenada por la salida de iones  $K^+$  del interior de los liposomas. Esta hiperpolarización induce la entrada del colorante a la vesícula y la disminución en la fluorescencia. Posteriormente se realizaron adiciones crecientes de KCl (1 mM a 52

mM), que provocan depolarizaciones por la entrada de  $K^+$  a los liposomas y movilización del colorante al exterior de la vesícula, lo que implica aumento en fluorescencia. Todo lo anterior fue detectado a una longitud de onda de 620/670 nm (excitación/emisión). La figura 33B muestra que el oligómero de Cry11Aa formado en presencia de Cyt1Aa presenta una alto índice de permeabilización a membrana, en contraste con las proteínas Cry11Aa y Cyt1Aa monoméricas, que mostraron actividad formadora de poro marginal. Los controles ocupados en el ensayo fueron valinomicina (ionóforo específico para  $K^+$ ) como control positivo y el buffer de trabajo como control negativo (Figura 33A).

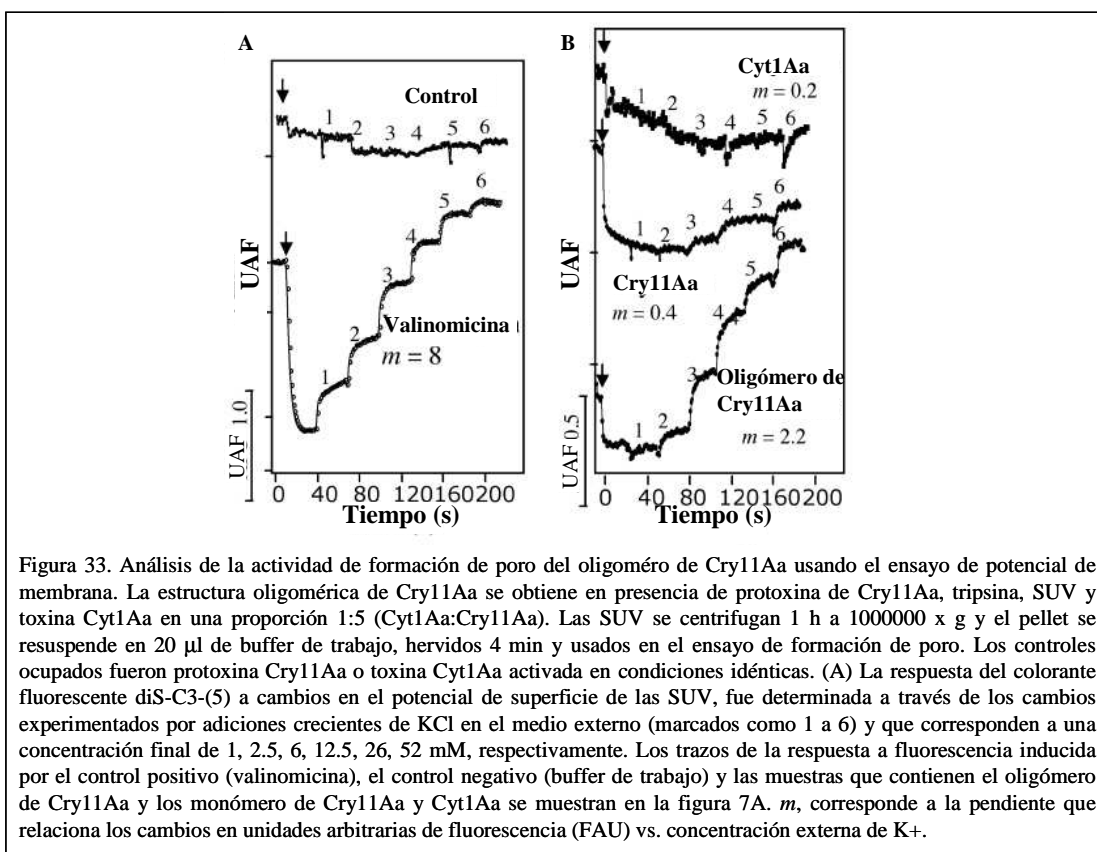
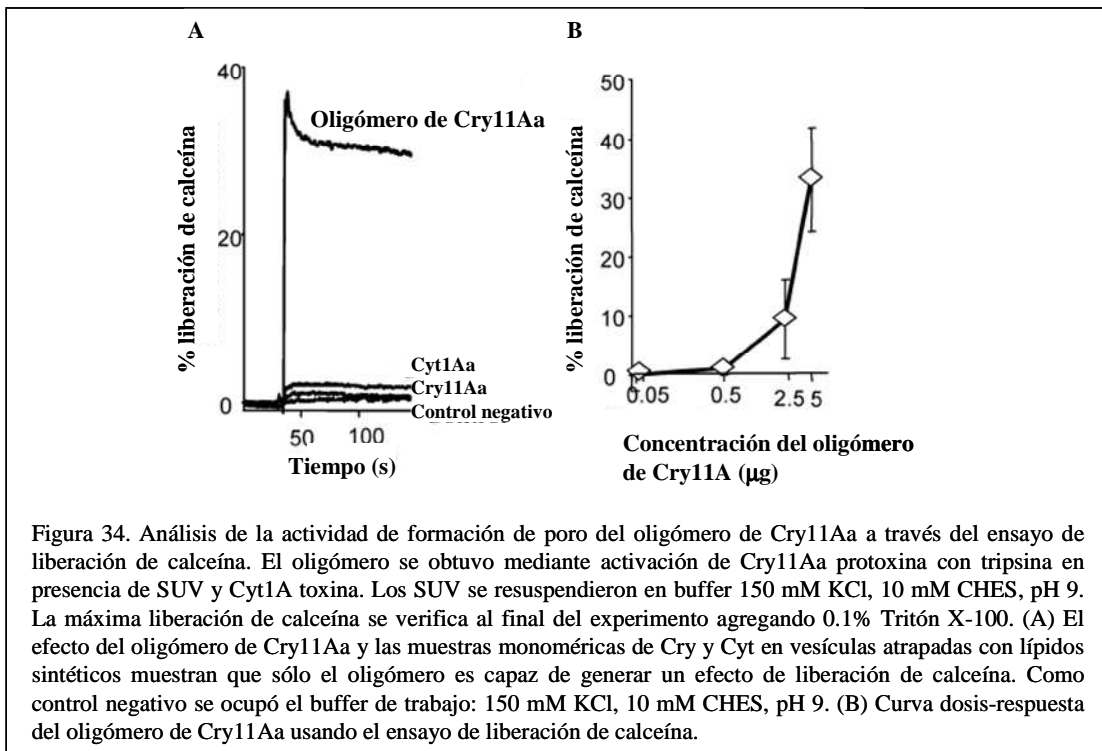


Figura 33. Análisis de la actividad de formación de poro del oligómero de Cry11Aa usando el ensayo de potencial de membrana. La estructura oligomérica de Cry11Aa se obtiene en presencia de protoxina de Cry11Aa, tripsina, SUV y toxina Cyt1Aa en una proporción 1:5 (Cyt1Aa:Cry11Aa). Las SUV se centrifugan 1 h a 1000000 x g y el pellet se resuspende en 20  $\mu$ l de buffer de trabajo, hervidos 4 min y usados en el ensayo de formación de poro. Los controles ocupados fueron protoxina Cry11Aa o toxina Cyt1Aa activada en condiciones idénticas. (A) La respuesta del colorante fluorescente diS-C3-(5) a cambios en el potencial de superficie de las SUV, fue determinada a través de los cambios experimentados por adiciones crecientes de KCl en el medio externo (marcados como 1 a 6) y que corresponden a una concentración final de 1, 2.5, 6, 12.5, 26, 52 mM, respectivamente. Los trazos de la respuesta a fluorescencia inducida por el control positivo (valinomicina), el control negativo (buffer de trabajo) y las muestras que contienen el oligómero de Cry11Aa y los monómero de Cry11Aa y Cyt1Aa se muestran en la figura 7A. *m*, corresponde a la pendiente que relaciona los cambios en unidades arbitrarias de fluorescencia (FAU) vs. concentración externa de  $K^+$ .

Para comprobar la capacidad para formar poros que tiene el oligómero de Cry11Aa, se realizó el segundo ensayo de permeabilización de membrana. En este caso se analizó el efecto de dicha estructura sobre la integridad de SUV cargados con el fluoróforo calceína, que es un colorante que tiene la particularidad de apagarse o “quencharse” por efectos de concentración. La liberación del colorante, implicaría,

aumento en fluorescencia y actividad formadora de poro. Para ello, la cantidad de calceína liberada de los SUV fue monitoreada continuamente con el fin de detectar cualquier incremento en la intensidad de fluorescencia. Los datos se expresan en porcentaje de liberación de fluorescencia máxima obtenida cuando se adiciona tritón X-100 (control positivo). La figura 34A muestra que la estructura oligomérica de Cry11Aa induce una rápida liberación de la calceína atrapada en los SUV. En contraste, el efecto de las muestras monoméricas de Cry11Aa y Cyt1Aa tuvieron un efecto mínimo en la liberación del fluoróforo atrapado. En la figura 34B se muestra una curva dosis-respuesta donde se observa que existe una correlación directa entre la cantidad de fluoróforo liberado de los SUV y la concentración de oligómero de Cry11Aa ocupada para ello.



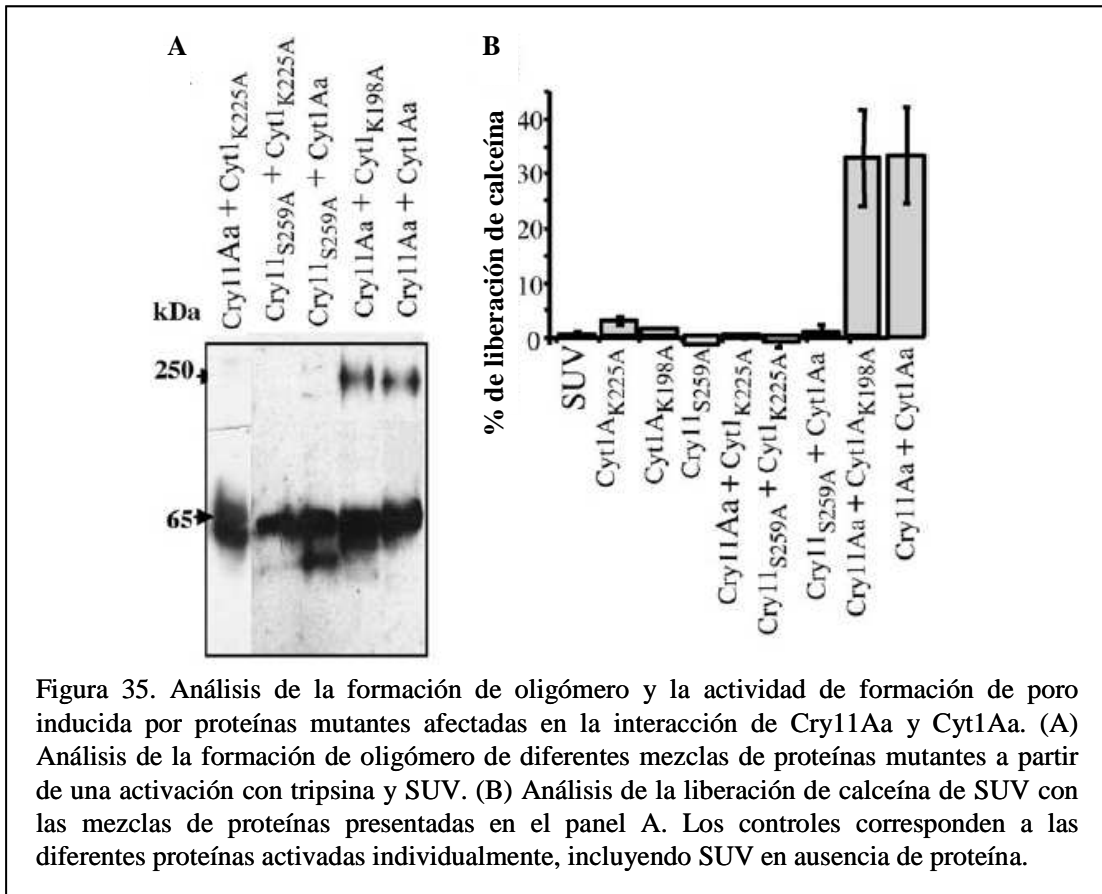
### 6.8. Las mutantes afectadas en sinergismo están afectadas en su proceso de formación de oligómero.

En los puntos anteriores demostramos que las mutantes sencillas en el asa  $\alpha 8$  de Cry11Aa y en el asa  $\beta 6$ - $\alpha E$  y  $\beta 7$  de Cyt1Aa, no sólo estaban afectadas en la interacción entre dichas proteínas, sino también en su actividad sinérgica sobre larvas de *Ae. aegypti*. En concreto, las mutantes S259A (Cry11Aa) y K225A en (Cyt1Aa) mostraron



una disminución en su actividad sinérgica cuando se evaluó su toxicidad conjunta con sus contrapartes silvestres. Adicionalmente, una mutante en el asa  $\beta 6$ - $\alpha E$  de Cyt1Aa (K198A) mostró incremento en su actividad sinérgica cuando se le combinaba con Cry11Aa silvestre.

Basándonos en lo anterior, se decidió usar estas mutantes para demostrar si la interacción entre Cry11Aa y Cyt1Aa es un paso necesario para inducir la formación de una estructura oligomérica por parte de Cry11Aa. La figura 35A muestra que la activación de S259A (Cry11Aa) con tripsina en presencia de SUV y Cyt1Aawt resulta en una severa reducción en la formación del oligómero de Cry11Aa. De forma similar, la activación de esta mutante en presencia de K225A (Cyt1Aa) resultó en la pérdida total en la capacidad para formar oligómero. En contraste, la activación de Cry11Aawt en presencia de la mutante K198A (Cyt1Aa) fue efectiva en su capacidad para oligomerizar, semejante a lo observado en la combinación de proteínas silvestres.



Finalmente, la actividad formadora de poro de estas mezclas de proteínas fue evaluada utilizando el ensayo de liberación de calceína atrapada en SUV. La figura 34B muestra que las mezclas de proteínas afectadas en su capacidad para formar oligómero tienen un porcentaje menor de liberación de calceína en SUV que la mezcla de las proteínas silvestres. Los controles de todas las proteínas de forma individual fueron también analizados mostrando nula liberación de calceína (Figura 35B). En contraste, la activación de Cry11Aa en presencia de la mutante K198A (Cyt1Aa) (que mostró una eficiente formación de oligómero) mostró una alta capacidad de liberación de calceína (similar a la de las proteínas silvestres), por lo que se concluye que existe una estricta correlación entre la interacción física de Cry11Aa y Cyt1Aa y su capacidad de formar una estructura oligomérica funcional que se inserte en membrana y forme el poro iónico, además de que dicho proceso también está directamente relacionado con el sinergismo entre Cry11Aa y Cyt1Aa.

Los resultados sobre la oligomerización de Cry11Aa se encuentran en el Apéndice II (página 129) y están publicados bajo la siguiente cita: **Pérez, C.**, Muñoz-Garay, C., Portugal, LC, Sánchez, J., Gill, SS, Soberón, M. y Bravo, A. *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. 2007. Cell. Microbiol. *En prensa*.

## 7. DISCUSIÓN

El cristal paraesporal producido por Bti es altamente efectivo para el control de diferentes mosquitos vectores de enfermedades infecciosas, por lo cual, ha sido usado extensivamente durante más de 20 años sin generar insectos resistentes en campo (Guillet *et al.*, 1990; Regis *et al.*, 2000). La alta eficacia de Bti se debe a que su cristal está compuesto por múltiples toxinas con diferentes modos de acción. Además, las toxinas tipo Cyt sinergizan el efecto tóxico de las toxinas Cry, abatiendo incluso la resistencia a dichas proteínas (Wirth *et al.*, 1997; Wirth *et al.*, 2005).

Los primeros en demostrar que no bastaba la presencia de una sola de las  $\delta$ -endotoxinas de Bti para tener una alta actividad mosquitocida fueron Wu y Chang en 1985. Años más tarde, en 1994, Wu y colaboradores, clonaron y expresaron los genes que codificaban para Cry11Aa y Cyt1Aa en cepas acristalíferas de Bt. De esta manera, lograron determinar las LC<sub>50</sub> para cada toxina de forma individual, y luego en combinaciones en las cuales se usaban proporciones distintas, que iban desde cantidades equimoleculares hasta excesos 10 veces mayores de una toxina con respecto a la otra. En todos los casos, observaron que existía un efecto sinérgico marcado cuando se utilizaban a las dos toxinas en conjunto. Un año más tarde, Crickmore *et al.*, 1995 y Poncet *et al.*, 1995, también realizaron experimentos de este tipo, pero además incluyeron combinaciones de las otras dos  $\delta$ -endotoxinas de amplia proporción en Bti: Cry4Aa y Cry4Ba. Con esto fueron capaces de establecer dosis letales medias para las diversas toxinas de Bti en combinación, y demostrar que una de las mezclas más tóxicas siempre resultaba la de Cry11Aa+Cyt1Aa, sobre todo para larvas de *Ae. aegypti*. No obstante lo anterior, hasta antes del 2005 no había ningún estudio a nivel molecular que explicara o hipotetizara sobre el posible mecanismo de sinergismo que se daba entre las toxinas de Bti, de ahí que el propósito principal de nuestro estudio fuera comenzar a entender las bases moleculares que rigen el sinergismo y establecer un modelo general de acción para el mismo.

En este trabajo demostramos que la proteína Cyt1Aa sinergiza la toxicidad de Cry11Aa funcionando como un receptor de la misma. Encontramos que la toxina

Cry11Aa se une con gran afinidad a la toxina Cyt1Aa, tanto en solución como en su forma insertada en membrana. De hecho, a partir de un ensayo de ELISA competitiva se pudo establecer que la  $K_d$  aparente para la combinación de Cry11Aa y Cyt1Aa es de 0.4 nM. Además, demostramos que la unión de Cry11Aa a VMMA de *A. aegypti* incrementa considerablemente cuando las vesículas están previamente incubadas con Cyt1Aa (Figuras 20 y 21), lo que sugiere que Cyt está actuando como un receptor extra para Cry11Aa.

Previamente se sugirió que las toxinas Cyt1Aa y Cyt2Aa se insertan en la membrana a través de las láminas  $\beta$ , dejando expuesta el asa que une a  $\beta 6$ - $\alpha E$  (Li *et al.*, 1996). El rol del asa  $\beta 6$ - $\alpha E$  y de parte de la lámina  $\beta 7$  de Cyt1Aa en la unión con Cry11Aa, fue confirmada por ensayos de competencias heterólogas usando péptidos sintéticos correspondientes a dichas regiones (Figura 26) y mutagénesis sitio-dirigida (Figura 29), demostrándose que dichas regiones son realmente importantes en la interacción de Cry11Aa con Cyt1Aa.

De manera similar, se demostró que hay epítopes específicos en Cry11Aa que están involucrados en la unión con Cyt1Aa. Se había demostrado que la toxina Cry11Aa interactúa con su receptor a través del asa  $\alpha 8$  localizada en el dominio II, y probablemente a través de la lámina  $\beta 4$  y el asa 3 (Fernández *et al.*, 2005). Sorpresivamente, en los ensayos de competencia heteróloga la unión de Cry11Aa es desplazada por los péptidos sintéticos que mimetizan las regiones que corresponden al asa  $\alpha 8$ , la lámina  $\beta 4$  y también el asa 2 de Cry11Aa (Figura 27). Estos resultados mostraron que la interacción entre Cry11Aa y Cyt1Aa involucraba epítopes que estaban también involucrados en la interacción natural de Cry11Aa con su receptor en el intestino del mosquito. Esto también sugiere que la unión de Cry11Aa hacia Cyt1Aa insertada en membrana, se asemeja a la interacción de Cry11Aa a las membranas de mosquito como si Cyt1Aa fuera su receptor natural.

Por todo lo anterior, podríamos establecer que la unión de la toxina Cry11Aa hacia Cyt1Aa a través de aminoácidos específicos, podría constituir las bases del sinergismo. Para identificar si estos residuos son realmente importantes, se caracterizaron mutantes tanto en Cry11Aa (Figura 28) como en Cyt1Aa (Figura 29). Trabajo previo demostró que la mutante E266A en el asa  $\alpha 8$  del dominio II de Cry11Aa estaba afectada en su unión natural al receptor localizado en *Ae. aegypti* lo que conlleva a un decremento directo en la toxicidad hacia la larva, mientras que por su parte, la mutante S259A, localizada en la misma asa y el mismo dominio II, no presentó efectos ni sobre toxicidad, ni sobre su unión a receptor (Fernández *et al.*, 2005). El análisis de estas mutantes reveló que ambas están afectadas en sinergismo con Cyt1Aa (Tabla 15, Figura 30). El decremento en sinergismo en las mutantes de Cry11Aa correlaciona con su reducción en afinidad hacia Cyt1Aa (Tabla 15). En el caso de la toxina Cry1C, activa contra insectos lepidópteros y dípteros, una mutación en el asa 3 del dominio II (S438Y) abolió completamente la toxicidad y la unión a VMMA de *S. littoralis* pero tuvo un efecto menor en toxicidad y unión sobre VMMA de *A. aegypti* (Abdul-Rauf y Ellar, 1999). Este es otro ejemplo de que ciertos residuos en el dominio II pueden ejercer un rol diferencial hacia diferentes receptores. Nuestros resultados muestran que el residuo S259 en el asa  $\alpha 8$  pueden tener un rol diferencial en la unión natural a su receptor en membrana o hacia Cyt1Aa. Aunque los cambios en las constantes de afinidad ( $K_d$  aparente) de las mutantes no fueron grandes, hubo una buena correlación entre la reducción de la unión y la reducción en el sinergismo observado. La combinación de las mutantes Cyt1Aa-K225A y Cry11Aa-S259A mostró una  $K_d$  75 veces mayor que la de las proteínas silvestres, además de que no se observó sinergismo (FS=0.4, Tabla 15).

Nuestros resultados sugieren que la interacción de ambas toxinas involucra más de un sitio de contacto y que la mutagénesis de al menos dos residuos es necesaria para observar un decremento significativo en la unión y en sinergismo.

Por otro lado, ninguna de las mutantes en este trabajo, ni Cyt1A-K225A ó Cry11A-S259 que resultaron ser las más afectadas en afinidad y sinergismo, estuvieron afectada en su activación proteolítica, unión a VMMA de *Ae. aegypti* o toxicidad (Figura 28 y 29), lo que indica que ambas mutaciones no tuvieron efecto en las estructuras de las proteínas.

Aunado a lo anterior, también fuimos capaces de identificar una mutante en Cyt1Aa localizada en el asa  $\beta 6$ - $\alpha E$  (K198A) que mostró una ligera (pero reproducible) mayor afinidad en su unión contra Cry11A (Tabla 15 y Figura 31), lo cual correlaciona con un factor de sinergismo dos veces más alto. En el caso de la toxina Cry1Aa activa contra insectos lepidópteros, una mutación en el loop 2, N372A, incrementó la afinidad hacia el receptor y también la toxicidad hacia el lepidóptero *Limantria dispar* (Jenkins *et al.*, 2000). Por ello, se considera que la mutante Cyt1A-K198A podría ser útil en la producción de formulaciones de Bti más efectivas contra larvas de mosquito.

Los datos anteriores indican que la inserción de Cyt1Aa en membrana provee epítopes de unión que son reconocidos por asas en el dominio II de Cry11Aa, los cuales, al mismo tiempo, están involucrados con la unión al receptor natural en el intestino del mosquito. Los mecanismos más comunes de resistencia hacia toxinas tipo Cry1A en insectos lepidópteros son mutaciones que afectan la producción de receptor (Ferré y van Rie 2002). Este es también el caso de la larva del mosquito *C. quinquefasciatus* resistente a toxina Bin de *B. sphaericus* que tiene mutaciones que afectan el ensamblaje del receptor en la membrana (Wirth *et al.*, 2000a y 2000b). Por lo tanto, la interacción con Cyt1Aa podría facilitar la inserción de Cry11Aa hacia la membrana lo que incrementaría a su vez su toxicidad o suprimiría la resistencia debido a mutaciones en el receptor de Cry. La interacción entre estos epítopes específicos también fundamenta las bases de la acción sinérgica entre Cyt1Aa y Cry11Aa. Este es, por lo tanto, un ejemplo de una bacteria patogénica que lleva consigo a su toxina y al receptor funcional para esta, promoviendo, al mismo tiempo, la unión a la membrana blanco y el incremento en toxicidad.

Por otro lado, ya habíamos mencionado que en *E. coli* enterohemorrágica, se ha descrito que la bacteria es capaz de inyectar el receptor TIR dentro de las células hospederas para así poder llevar a cabo su mecanismo infectivo (Kenny *et al.*, 1997). Dado lo anterior, decidimos evaluar si la toxina Cyt1Aa, en su faceta de receptor, podría ser capaz de favorecer la formación de una estructura oligomérica de Cry11Aa, que fuera lo suficientemente eficiente como para formar poros, explicando así el incremento en toxicidad que presenta Cry11Aa en presencia de Cyt1Aa.

Está perfectamente documentado que las proteínas Cry son toxinas formadoras de poro que se secretan como proteínas solubles en agua y desarrollan cambios conformacionales con el fin de insertarse en la membrana de sus células blanco (Schnepf *et al.*, 1998; de Maagd *et al.*, 2003). Además, se sabe que en dichas bacterias, el estado de canal insertado en membrana fue obtenido después de la formación de una estructura oligomérica ó pre-poro que es perfectamente capaz de insertarse en membrana. Esta estructura oligomérica se produce después de la unión a receptor (Parker y Fiel, 2005). Diferentes toxinas Cry activas contra lepidópteros, coleópteros y dípteros forman estructuras de pre-poro después de la interacción con su receptor, localizado en las células intestinales: Cry1Ab (Tigue *et al.*, 2001; Gómez *et al.*, 2002b), Cry1Ac (Pardo-López *et al.*, 2006), Cry1Ca (Muñoz-Garay *et al.*, 2006; Herrero *et al.*, 2004), Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fa (Muñoz-Garay *et al.*, 2006), Cry3Aa, Cry3Ba, Cry3Ca (Rausell *et al.*, 2004b) y Cry4Ba (Likitivatanavong *et al.*, 2006).

En este trabajo, nosotros analizamos la oligomerización de Cry11Aa inducida por sus receptores nativos localizados en VMMA de *A. aegypti* y en presencia y ausencia de la proteína Cyt1Aa. Se estableció que Cyt1Aa en su forma de toxina activada incrementa la oligomerización de Cry11Aa en VMMA y en liposomas sintéticos (Figura 32), indicando que la interacción de Cry11Aa con esta proteína es suficiente para inducir un evento de oligomerización.

Con el fin de determinar que esa estructura oligomérica es funcional, se analizó su actividad para formar poros por medio de dos diferentes métodos fluorimétricos. Previamente se había reportado que el oligómero de otras toxinas Cry es altamente estable a temperaturas de 100°C y a la desnaturalización con urea (Rausell *et al.*, 2004a). En el caso del oligómero de Cry11Aa se observó que es igualmente estable a altas temperaturas, ya que es posible observarlo después de hervir la muestra en un gel desnaturalizante a través de Western Blot (Figura 32).

Como último paso a evaluar, decidimos demostrar si la interacción entre Cry11Aa y Cyt1Aa es un paso necesario para inducir la formación de oligómero de Cry11Aa, lo cual correlaciona con su capacidad de formar poros. Para esto, ocupamos a la mutante en Cry11Aa (S259A) que está afectada en su unión con Cyt1Aa (*Kd* 10 veces más alta) para realizar la activación *in vitro*, observándose que dicha mutante está

severamente afectada en su capacidad para formar oligómero y en su actividad formadora de poro (Figura 35), lo cual, nos sugiere que la interacción de Cry11Aa con Cyt1Aa es un paso importante para desencadenar la formación del oligómero.

De manera adicional, se mostró que las mutantes en Cyt1Aa (K225A y K198A) al usarse en la activación de Cry11Aa silvestre, presentaron fenotipos diferentes en su habilidad para formar poros. Por ejemplo, la mutante K225A de Cyt1Aa está afectada en su unión con Cry11Aawt ( $K_d$  10 veces mayor), a diferencia de la mutante K198A en Cyt1Aa que mostró una  $K_d$  menor que la combinación con Cry11Aa silvestre (0.3 nM). Si existiera una relación directa entre interacción y formación de pre-poro, cuando se ocuparan estas proteínas mutantes en los procesos de activación y formación de poro, observaríamos problemas en la actividad de la mutante K225A en combinación con Cry11Aa, mientras que con K198A el patrón sería al menos similar al obtenido con Cyt1Aa silvestre. Lo anterior fue comprobado experimentalmente (Figura 35). De hecho, la interacción de la mutante S259A (Cry11Aa) con la mutante K225A (Cyt1Aa), también resultó en un decremento en los niveles de oligomerización de Cry11A y no fue posible detectar actividad de formación de poro. Es importante recalcar que la interacción de estas dos mutantes mostró un valor de  $K_d$  75 veces mayor que el de la combinación de las proteínas silvestres. En contraste, la activación de Cry11Aa con la mutante K198A (Cyt1Aa) resultó en una producción eficiente de oligómero de Cry y una alta capacidad de formación de poro (Figura 35), lo que indica que existe una correlación entre la unión de Cry11Aa y Cyt1Aa, la formación del oligómero de Cry11A que desencadena el proceso de formación de poro y el sinergismo existente entre ambas proteínas.



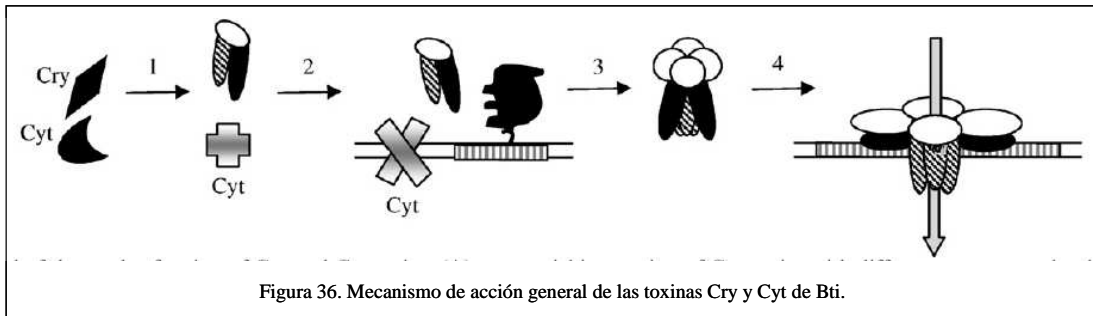
## 8. CONCLUSIÓN

La ingestión de Cyt1Aa por parte de larvas susceptibles de *Ae. aegypti* genera la unión de dicha toxina al intestino medio, evento que podría proveer de múltiples sitios de unión para la toxina Cry11Aa.

Los datos mostrados en este trabajo muestran que la toxina Cyt1Aa interacciona específicamente con Cry11Aa favoreciendo la formación de una estructura oligomérica de 250 kDa, lo que le daría el rango de receptor primario de Cry11Aa, pues funciona de manera similar a como lo hace la caderina con la toxina Cry1Ab en insectos lepidópteros como *M. sexta* (Gómez *et al.*, 2002b). Lo anterior explicaría el alto grado de actividad que presentan estas toxinas cuando se encuentran en combinación, y al mismo tiempo, respondería a la interrogante del porque el uso de Bti no ha generado resistencia en campo pese a tener más de 20 años de ser usado exhaustivamente.

Por lo tanto, el rol de las toxinas Cyt y Cry en la intoxicación de las larvas de insectos dípteros involucraría los siguientes 4 pasos (Figura 35):

1. Las toxinas Cry y Cyt son solubilizadas y activadas por proteasas propias del intestino del insecto bajo un ambiente alcalino y reductor.
2. La toxina tipo Cyt, al ser la más afín a membrana, se inserta en ella mientras la toxina Cry se une a su receptor disponible (ALP, toxina Cyt u otro).
3. La toxina Cry oligomeriza. Se propone que la toxina tipo Cyt estaría involucrado en la eficacia de este proceso, aunque no se descarta la idea de que otro receptor tipo caderina también favorezca dicho proceso de oligomerización.
4. El oligómero de Cry se inserta en membranas tipo rafts, lo que desencadena la formación de poros iónicos que conducirán a la célula a un desbalance osmótico que desencadenará en un proceso de lisis celular.



Por todo lo anterior, podemos concluir que la toxina Cyt1Aa es capaz de sinergizar y suprimir la resistencia de Cry11Aa en larvas de mosquitos, funciona como un receptor que provee de sitios de unión extra para Cry11Aa que pueden resultar en una eficiente formación de un estado de pre-poro que induce la lisis celular y hace más eficiente el proceso de muerte de la larva.

## 9. PERSPECTIVAS

El efecto sinérgico observado entre las  $\delta$ -endotoxinas producidas por Bt es sumamente importante. El hecho de que estas toxinas puedan cooperar entre ellas para aumentar la eficacia en la mortalidad contra insectos dípteros es por demás interesante, y más cuando se ha visto que dicha cooperatividad no se da con otras toxinas Cry activas contra lepidópteros ó coleópteros. De ahí la importancia de comenzar a entender el proceso molecular por medio del cual se lleva a cabo dicho fenómeno.

Nuestro trabajo representa el primer estudio formal de la relación que existe entre Cry11Aa y Cyt1Aa, tanto en presencia como en ausencia de membranas de su insecto blanco, y con ello intentar proponer un modelo preliminar que sustente las bases que soportan el sinergismo entre dichas toxinas. El hecho de identificar que estas proteínas interactúan a través de epítopes específicos y que una de ellas (Cyt1Aa) es capaz de favorecer la oligomerización de la otra (Cry11Aa), no sólo nos acerca a entender un poco la relación de estas proteínas en la patogénesis de Bt, si no a sugerir el uso de ingeniería genética para desarrollar proteínas Cry (dirigidas hacia otro tipo de insectos) que puedan interaccionar con Cyt, sinergizar, incrementar su toxicidad y erradicar problemas de resistencia en campo, lo cual daría a los bioinsecticidas elaborados a través de Bt una ventaja evolutiva considerable.

Por ello es que las perspectivas de este trabajo, aunque ambiciosas, están directamente dirigidas a la generación de toxinas Cry capaces de interaccionar con Cyt en cualquier tipo de insecto. Para esto, en el laboratorio se pretende evaluar la forma en que Cyt1Aa se inserta en membrana, pues a la fecha, sólo se cuentan con estudios preliminares acerca de este rubro. También sería interesante evaluar si existe un tipo de lípido que es capaz de funcionar como receptor para la toxina Cyt1Aa. Para las toxinas tipo Cry5 se ha podido identificar que esto es factible (Griffitts *et al.*, 2005), por lo que trabajos centrados específicamente en la actividad de Cyt1Aa responderán a esta interrogante.

Por otro lado, también se planean hacer estudios en bicapas lipídicas planas del oligómero de Cry11Aa, esto con el fin de determinar todas las características electrofisiológicas de esta estructura.

Por último, se planea hacer nuevos estudios para analizar las posibles regiones de interacción que Cyt1Aa pueda tener con las otras proteínas Cry de Bti como Cry4Aa y Cry4Ba, e incluso con otras toxinas como las Bin producidas por *Bacillus sphaericus*, ya que, como se ha mencionado antes, Cyt1A es capaz de sinergizar con todas ellas, abatir su resistencia e incluso conferirles toxicidad hacia larvas de mosquitos a las cuales no son naturalmente tóxicas. Dichos trabajos sustentarían la hipótesis de que Cyt1Aa funciona como receptor para todas las toxinas Cry de Bti y validando la importancia de su presencia en el cristal paraesporal de Bti.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullah, M.A.F., Valaitis, A.P., Dean, D.H., 2006. *BMC Biochem.* **7(16)**:1471-2091.
- Abdullah, M.A.F., Alzate, O., Mohammad, M., McNall, R.J., Adang, M.J., Dean, D.H., 2003. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5343–5353.
- Abdul-Rauf, M. & Ellar, D. J. 1999. *Curr. Microbiol.* **39**:94–98.
- Abrami, L, Fivaz, M. and van der Goot F.G. 2000a. *Int. J. Med. Microbiol.* **290(4-5)**:363-367.
- Abrami, L. and Van der Goot, G. 2000b. *Trends Microbiol.* **8(4)**:168–172.
- Adams, L. F., J. E. Visick, and H. R. Whiteley. 1989. *J. Bacteriol.* **171**:521–530.
- Agatep, R., Kirkpatrick R. D., Parchaliuk, D. L., Woods, R. A. and Gietz, R. D. 1998. University of Manitoba, Canada. 12-15.
- Agrawal, N., P. Malhotra, and R. K. Bhatnagar. 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4583–4592.
- Aimanova, K. G., M. Zhuang, and S. S. Gill. 2006. *J. Invertebr. Pathol.* **92**:178–187.
- Angst, B. D., C. Marcozzi, and A. I. Magee. 2001. *J. Cell Sci.* **114**:629–641.
- Angsuthanasombat, C., Crickmore N. and Ellar, D. J. 1993. *FEMS Microbiol. Lett.* **111**:255-261.
- Angsuthanasombat, C., Crickmore N. and Ellar, D. J. 1992. *FEMS Microbiol. Lett.* **73**:63–68.
- Aronson, A. I. and Shai, Y. 2001. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**:1-8.
- Aronson, A. I., Beckman, W. and Dunn P. 1986. *Microbiol. Rev.* **50**:1-24.
- Baird, J. K. 2000. *Drugs.* **59**: 719-43.
- Bechtel, D. B. and Bulla, L.A. Jr. 1976. *J. Bacteriol.* **127**:1472-1481.
- Beegle, C. C. and Yamamoto, T. 1992. *Can. Entomol.* **124**:587–616.
- Becker, N., 2000. *In: Entomopathogenic Bacteria. From Laboratory to Field Application.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **383**.
- Belfiore, C. J., Vadlamudi, R. K., Osman, Y. A. and Bulla, L.A. Jr. 1994. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**:359-364.
- Ben-Dov, E. Boussiba, S. y Zaritsky, A. 1995. *J. Bacteriol.* **177**:2851–2857.
- Berry, C., O’Neil, S., Ben-Dov, E., Jones, A.F., Murphy, L., Quail, M.A., Holden, M.T.G., Harris, D., Zaritsky, A. and Parkhill, J. 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5082–5095.
- Blaustein, L. and Margalit, J. 1991. *Hydrobiol.* **212**:67–76.
- Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C. and Lescar, J. 2006. *J. Bacteriol.* **188(9)**:3391-3401.
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, DJ. and Li, J. 2005. *J. Mol. Biol.* **348**:363-382.
- Bosch, D., Schipper, B., der Kleij H., de Maagd, R. A. and Willem, J. S. 1994. *Biotech.* **12**:915-918.
- Bravo, A., Gill, S.S., and Soberón, M. 2007. *Toxicon.* **49**: 423–435.

- Bravo, A., Gill, S.S. and Soberón M. 2005. *In: Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier BV, Amsterdam, **175-206**.
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Zhuang, M., Gill, S. S. & Soberón, M. 2004. *Biochim. Biophys. Acta* **1667**:38–46.
- Bravo, A., Sanchez, J., Kouskoura, T. and Crickmore, N. 2002. *J. Biol. Chem.* **277(27)**:23985-23987.
- Bravo, A. 1997. *J. Bacteriol.* **179**:2739-2801.
- Bravo, A., Hendrickx K., Jansens, S. and Peferoen, M. 1992. *J. Invertebr. Pathol.* **60**:247-254.
- Breeden, L. & Nasmyth, K. 1985. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **50**:643–650.
- Briceño, B, Gómez, D. H., Argett, R. E., Montesano, R., Vázquez Martínez, A. L., Ibáñez, B. S., Madrigal, A. G., Ruíz, M. C., Flisser, A. and Tapia, R. 1996. *Emerg. Infect. Diseases.* **2**:133-135.
- Brossier, F. & Mock, M. 2001. *Toxicon.* **39**:1747–1755.
- Burkhard, P., Stetefeld, J., and Strelkov, S. V. 2001. *Trends Cell Biol.* **11**:82–88
- Burton, S. L., Ellar, D. J., Li, J. and Derbyshire, D. J. 1999. *J. Molec. Biol.* **287**:1011-1022.
- Butko, P. 2003. *Appl. Environ. Microbiol.* **69(5)**:2415–2422.
- Butko, P., Huang, F., Pusztai-Carey, M. and Surewicz, W. K. 1997. *Biochem.* **36**:12862–12868.
- Butko, P., Huang, F., Pusztai-Carey, M. and Surewicz, W. K. 1996. *Biochem.* **35**:11355–11360.
- Buzdin, A. A., Revina, L. P., Kostina, L. I., Zalunin, I. A. and Chestukhina, G. G. 2002. *Biochem. Mosc.* **67(5)**:540-6.
- Cabiaux, V., Wolff, C., Ruyschaert, J.M. 1997. *Int. J. Biol. Macromol.* **21**:285-298.
- Caramori, T., Albertini, A. M. and Galizzi, A. 1991. *Gene.* **98**: 37-44.
- Carlson, C. R., Caugant, D. A. and Kolstø, A. B. 1994. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1719–1725.
- Chang, C., Yu, Y. M., Dai, S. M., Law, S. K. and Gill, S. S. 1993. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:815–821.
- Chen, J., M. R. Brown, G. Hua, and M. J. Adang. 2005. *Cell Tissue Res.* **321**:123–129.
- Chen, X. J., Lee, M. K. and Dean, D. H. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**:9041–9045.
- Chilcott, C. N. and Ellar, D. J. 1988. *J. Gen. Microbiol.* **134**:2551–2558.
- Chow, E., Singh, G. J. P. and Gill, S. S. 1989. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2779–2788.
- Chothia, C., Levitt, M., and Richardson, D. 1981. *J. Mol. Biol.* **145(1)**:215–250
- Cohen, S. 1991. M.Sc. *Thesis*. Ben-Gurion University of the Negev, Be'er-Sheva, Israel.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J, Bravo, A. and Dean, D.H. 2007. [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schenepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. and Dean, D. H. 1998. *Microbiol. Mol. Rev.* **62**:807-813.
- Crickmore, N., Bone E. J., Williams, J. A. and Ellar, D. J. 1995. *FEMS Microbiol. Lett.* **131**:249–254.
- Chilcott, C. N. & Ellar, D. J. 1988. *J. Gen. Microbiol.* **134**:2551–2558.
- Dai, Shu-Mei y Gill SS. 1993. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* **23(2)**:273-283.
- Darboux, I., Pauchet, Y., Castella, C., Silva-Filha, M. H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.-F. & Pauron, D. 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**:5830–5835.
- Darboux, I., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., Pauron, D., 2001. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **31**:981–990.

- de Barjac, H. and D. J. Sutherland. 1990. *In Rutgers University Press*. New Brunswick, N.J. **1**:3–217.
- de Maagd, R.A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., and Schnepf, H.E. 2003. *Annu. Rev. Genet.* **37**:409–433.
- de Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N. 2001. *Trends. Genet.* **17**:193-199.
- de Maagd, R. A., Bakker, P. L., Masson, L., Adang, M. J. and Sangadala, S. 1999. *Mol. Microbiol.* **31**:463-471.
- de Maagd, R. A., M. S. G. Kwa, H. Van der Klei, T. Yamamoto, B. Schipper, J. M. Vlak, W. J. Stiekema, and D. Bosch. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1537–1543.
- Dean, D. H., Rajamohan, F., Lee, M. K., Wu, S. J., Chen, J., Alcántara, E. and Hussain, S.R. 1996. *Gene.* **179**:111-117.
- Delécluse, A., S. Poncet, A. Klier, and G. Rapoport. 1993. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3922–3927.
- Delécluse, A., J.-F. Charles, A. Klier, and G. Rapoport. 1991. *J. Bacteriol.* **173**:3374–3381.
- Denolf, P., K. Hendrickx, J. Van Damme, S. Jansens, M. Peferoen, D. Degheele, and J. Van Rie. 1997. *Eur. J. Biochem.* **248**:748–761.
- Dirección General de Epidemiología, SSA. México. 1997-2000.
- Dong, L., Chen, S., Bartsch, U. & Schachner M. 2003. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **301**:60–70.
- Dorsch, J. A., M. Candas, N. B. Griko, W. S. Maaty, E. G. Midboe, R. K. Vadlamudi, and L. A. Bulla, Jr. 2002. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**:1025–1036.
- Dow, J.A.T. 1986. *Adv. Insect Physiol.* **19**:187-238.
- Drobniewski, F. A., and D. J. Ellar. 1988. *Biochem. Soc. Trans.* **16**:38–40.
- Ebersold, H.R., Readdy, T.L. and A.E. Bastian. 1978. *Experientia.* **34**:1672-1675.
- Engh, R. A., A. Girod, V. Kinzel, R. Huber, and D. Bossemeyer. 1996. *J. Biol. Chem.* **271**:26157–26164.
- English, L.H., Readdy, T.L. y A.E. Bastian. 1991. *Insect Biochem.* **21**:177-184.
- Earp, D. J., and D. J. Ellar. 1987. *Nucleic Acids Res.* **15**:3619.
- Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**:5389–5394.
- Falnes, P. O., and K. Sandvig. 2000. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**:407–413.
- Federici, BA, Park, HW., Bideshi, DK., Wirth, MC. and Johnson, J. 2003. *J. Exp. Biol.* **206**:3877-3885.
- Federici, BA. 1995. *J. Amer. Mosquito Control Assoc.* **11(2)**: 260-268.
- Feitelson, J. S. 1993. *In: Advanced engineered pesticides.* Marcel Dekker, Inc. New York, **63–71**.
- Feitelson, J. S., J. Payne, and L. Kim. 1992. *Bio-Technology.* **10**:271–275.
- Fernández, L.E., Aimanova, K.G., Gill, S.S., Bravo, A., and Soberón, M. 2006. *Biochem J.* **394**: 77–84.
- Fernández, L. E., Pérez, C., Segovia, L., Rodríguez, M. H., Gill, S. S., Bravo, A y Soberón. M. 2005. *FEBS Lett.* **579**:3508–3514.
- Ferré, J. & van Rie, J. (2002) *Ann. Rev. Entomol.* **47**:501–533.
- Finney, D. 1971. *In Probit analysis.* Cambridge University Press, UK, **50-80**.
- Flannagan, R. D., C. G. Yu, J. P. Mathis, T. E. Meyer, X. Shi, H. A. Siqueira, and B. D. Siegfried. 2005. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**:33–40.

- Fons, F., Dullemans, A., Cees W. 1995. *Appl. Environ. Microbiol.* **61(7)**:2601-2605.
- Gahan, L. J., F. Gould, and D. G. Heckel. 2001. *Science.* **293**:857–860.
- Galitsky N, Cody V, Wojtczak A, Ghosh D, Luft JR, Pangborn W, English L. 2001. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **57(8)**:1101-1109.
- Garczynski, S.F. y M.J. Adang. 1995. *Insec. Biochem. Molec. Biol.* **25**:409-415.
- Garczynski, S. F., Crim, J. W. and Adang, M. J. 1991. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2816-2820.
- Gazit, E., N. Burshtein, D. J. Ellar, T. Sawyer, and Y. Shai. 1997. *Biochem.* **36**:15546–15554.
- Ge, A. Z., Shivarona, N. I. and Dean, D. H. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**:4037-4041.
- Georghiou, G. P., and M. C. Wirth. 1997. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1095–1101.
- Georghiou, G. P., Malik, J. I., Wirth, M. and Sainato, K. 1992. *Research Annual Report.* Univ. of California Press, Riverside, CA.
- Gilbert, R.J., Jimenez, J.L., Chen, S., Tickle, I.J., Rosjohn, J., Parker, M., Andrew, P.W. and Saibil, H.R. 1999. *Cell.* **97(5)**:647-655.
- Gill, M., and D. Ellar. 2002. *Insect Mol. Biol.* **11**:619–625.
- Githeko A.G., Lindsay S. W., Confalonieri E.U., Patz J.A. 2000. *Bulletin W H O. Internal J. Public Health.* **78(9)**:1136-1147.
- Goldberg, L. J., and J. Margalit. 1977. *Mosquito News.* **37**:355–358.
- Golemis, E. A., Gyuris, J. and Brent, R. 1996. *Curr. Protoc. Molec. Biol.* **20**:1-28.
- Gómez, I., Dean DH., Bravo, Alejandra and Soberón, Mario. 2003. *Biochem.* **42**:10482-10489.
- Gómez, I., Miranda-Ríos, J., Rudiño-Piñera, E., Oltean, D.I., Gill, S.S., Bravo, A. and Soberón, M. 2002a. *J. Biol. Chem.* **277**:30137-30143.
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A. and Soberón, M. 2002b. *FEBS Letters.* **513**:242-246.
- Gómez, I., Oltean, D.I., Sánchez, J., Gill, S.S., Bravo, A. and Soberón, M. 2001. *J. Biol. Chem.* **276**:28906-28912.
- Gonzalez, J. M., Jr., and B. C. Carlton. 1984. *Plasmid.* **11**:28–38.
- González, J. M., Jr., H. T. Dulmage, and B. C. Carlton. 1981. *Plasmid.* **5**:351–365.
- Griffiths, JS., Haslam, SM., Yang, T., Garczynski, SF., Mulloy, B., Morris, H., Cremer, P. S., Dell A., Adang M. J., y Aroian R. V. 2005. *Science.* **307**:922–925.
- Gringorten, J.L., Milne, R.E., Fast, P.G., Sohi, S.S. y K. Van Frankenhuyzen. 1992. *J. Invertebr. Pathol.* **60**:47-62.
- Grochulsky, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.L., Brousseau, R. and Cygler, M. 1995. *J. Mol. Biology.* **254**:447-464.
- Gumbiner, B. M. 1996. *Cell.* **84**:345–357.
- Guerchicoff, A., Delécluse, A., Rubinstein, C.P., 2001. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1090–1096.
- Guerchicoff, A., Ugalde, R. A. & Rubinstein, C. P. 1997. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2716–2721.
- Guillet, P., Kurstack, D. C., Philippon, B. & Meyer, R. 1990. *In: Bacterial Control of Mosquitoes and Blackflies,* Rutgers Univ. Press, Piscataway, NJ. **187–190**.
- Gyuris, J., Golemis, E. A., Chertkov, H. and Brent, R. 1993. *Cell.* **75**:791-803.



- Haider, M. Z. and Ellar, D. J. 1989. *Biochim. Biophys. Acta.* **978**:216–222.
- Hara, H., S. Atsumi, K. Yaoi, K. Nakanishi, S. Higurashi, N. Miura, H. Tabunoki, and R. Sato. 2003. *FEBS Lett.* **538**:29–34.
- Herrero, S., T. Gechev, P. L. Bakker, W. J. Moar, and R. A. de Maagd. 2005. *BMC Genomics.* **6**:96.
- Herrero, S., Gonzalez-Cabrera, J., Ferré, J., Bakker, P.L., and de Maagd, R.A. 2004. *Biochem J.* **384**:507–513.
- Hodgman, T. C. and D. J. Ellar. 1990. *DNA Seq.* **1**:97–106.
- Hofmann, C., H. Vanderbruggen, H. Höfte, J. Van Rie, S. Jansens, and H. Van Mellaert. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**:7844–7848.
- Hossain, D. M., Y. Shitomi, K. Moriyama, M. Higuchi, T. Hayakawa, T. Mitsui, R. Sato, and H. Hori. 2004. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4604–4612.
- Houk, E. J., Arcus, Y. M. and Hardy, J.L. 1986. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **3**:135-146.
- Höfte, H. and H. R. Whiteley. 1989. *Microbiol. Rev.* **53**:242–255.
- Hua, G., Jurat-Fuentes, J.L. and Adang, M.J. 2004. *J. Biol. Chem.* **279**:28051-28056.
- Ibarra, J. E. y Del Rincón, C. 2001. In: *Bioinsecticidas. Fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el control integrado de plagas.* Phytoma, España, **245-269**.
- Ibarra, J. E., and Federici, B. A. 1986. *FEMS Microbiol. Lett.* **34**:79–84.
- Isturiz, RE., Gubler, DJ. and del Castillo, JB. 2000. *Infectious Disease Clinics of North America.* **14(1)**:121-140.
- Jenkins, J.L., M. K. Lee, A.P. Valaitis, A. Curtiss y D.H. Dean. 2000. *J. Biol. Chem.* **275**:14423-14431.
- Jurat-Fuentes, J.L., and Adang, M.J. 2006. *J. Invertebr. Pathol.* **92**: 166–171.
- Jurat-Fuentes, J. L., and M. J. Adang. 2004. *Eur. J. Biochem.* **271**:3127–3135.
- Kramer, A. & Schneider-Mergener, J. 1998. *Methods Mol. Biol.* **87**:25–39.
- Keeton, T. P., and L. A. Bulla, Jr. 1997. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3419–3425.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D. J., Frey, E. A. & Finlay, B. B. 1997. *Cell.* **91**:511–520.
- Knight, P. J., B. H. Knowles, and D. J. Ellar. 1995. *J. Biol. Chem.* **270**:17765–17770.
- Knight, P. J., N. Crickmore, and D. J. Ellar. 1994. *Mol. Microbiol.* **11**:429–436.
- Knowles, B.H. 1994. *Adv. Insect Physiol.* **24**:275–308.
- Knowles, B. H., P. J. White, C. N. Nicholls, and D. J. Ellar. 1992. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **248**:1–7.
- Knowles, B. H., M. R. Blatt, M. Tester, J. M. Horsnell, J. Carroll, G. Menestrina, and D. J. Ellar. 1989. *FEBS Lett.* **244**:259–262
- Knowles, B.H. and D.J. Ellar. 1987. *Biochim. Biophys. Acta.* **924**:509-518.
- Komano, T., Yamigawa, M., Nishimoto, T., Yushisue, H., Tanabe, K., Sen, K. and Sakai, H. 1998. *Isr. J. Entomol.* **32**:185-198.
- Koni, P. A., and D. J. Ellar. 1993. *J. Mol. Biol.* **229**:319–327.
- Krieger IV, Revina LP, Kostina LI, Buzdin AA, Zalunin IA, Chestukhina GG, Stepanov VM. 1999. *Biochem. Mosc.* **64(10)**:1163-8.
- Kronstad, J. W., and H. R. Whiteley. 1984. *J. Bacteriol.* **160**:95–102.

- Kumate, J., Gutiérrez, G., Muñoz, O. y Santos, JI. 1998. In: *Manual de Infectología Clínica*. Méndez Editores, México, **410-415**.
- Kurtak, D. C., C. Back, A. Chalifour, J. Doannio, J. Dossou-Yovo, J. Duval, P. Guillet, R. Meyer, M. Ocran, and B. Wahle. 1989. *Isr. J. Entomol.* **23**:21–28.
- Lacey, Lawrence A. y Lacey Cynthia M. 1990. *J. Amer. Mosquito Control Assoc.* **6**:2-74.
- Laemmli, UK. 1970. *Nature.* **227(259)**:680-5.
- Lecadet, M. M., E. Frachon, V. C. Dumanoir, H. Ripouteau, S. Hamon, P. Laurent, and I. Thiéry. 1999. *J. Appl. Microbiol.* **86**:660–672.
- Lee, M. K., and D. H. Dean. 1996. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**:575–580.
- Lee, M. K., B. A. Young, and D. H. Dean. 1995. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**:306–312.
- Lereclus, D., J. Ribier, A. Klier, G. Menou, and M.-M. Lecadet. 1984. *EMBO J.* **3**:2561–2567.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M. & Chaufaux, J. 1995. *Biotechnology.* **13**:67–71.
- Li, J., P. A. Koni, and D. J. Ellar. 1996. *J. Mol. Biol.* **257**:129–152
- Li, J., Carroll, J. and Ellar, D.J. 1991. *Nature.* **353**:815-821.
- Likitvivanavong, S., Katzenmeier, G., and Angsuthanasombat, Ch. 2006. *Arch Biochem Biophys.* **445**:46–55.
- Liu, S.S., Dean, D.H., 2006. *Prot. Engineer. Des. Sel.* **19**:107–111.
- Lorence, A., A. Darszon, C. Diaz, A. Liévano, R. Quintero and A. Bravo. 1995. *FEBS Lett.* **360**:217–222.
- Lu, Y. J., and M. J. Adang. 1996. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**:33–40.
- Maniatis, Sambroose y Fritsch. 1992. In: *Molecular Cloning 3. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab. Press. **238-240**.
- Margalit, J., and H. Bobroglo. 1984. *Z. Angew. Entomol.* **97**:516–520.
- Martens, J.W.M., Visser, B., Vlak, J.M. y D. Bosch. 1995. *Mol. Gen. Genet.* **247**:482-487.
- Martínez-Torres E. 1995. *Salud Pública Mex.* **37**:29-44.
- Masson, L., Tabachnik, B. Liu, Y.B., Brusseau, R. and Schwartz, J.L. 1999. *J. Biol. Chem.* **274**:31996-32000.
- Masson, L, Lu, Y.J., Mazza, A., Brosseau, R., Adang, M.J. 1995. *J. Biol. Chem.* **270**:20309-20315.
- McNall, R. J., and M. J. Adang. 2003. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**:999–1010.
- Meadows, M. P. 1993. In: *Bacillus thuringiensis in the environment. Ecology and Risk Assessment*. Wiley, New York, **193–220**.
- Melton, J.A., Parker, M.W., Rossjohn, J., Buckley, J.T. and Tweten, R.K. 2004. *J. Biol. Chem.* **279(14)**:14315-14322.
- Midboe, E. G., M. Candas, and L. A. Bulla, Jr. 2003. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **135**:125–137.
- Morin, S., R. W. Biggs, M. S. Sisterson, L. Shriver, C. Eilers-Kirk, D. Higginson, D. Holley, L. J. Gahan, D. G. Heckel, Y. Carriere, T. J. Dennehy, J. K. Brown, and B. E. Tabashnik. 2003. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**:5004–5009.
- Morse, R.J., Yamamoto, T. and Stroud R.M. 2001. *Structure.* **9**:409-417.

- Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Darszon, A., de Maagd, R.A., Bakker, P., Soberón, M., and Bravo, A. 2006. *J. Membr. Biol.* **212**: 61–68.
- Nagamatsu, Y., S. Toda, T. Koike, Y. Miyoshi, S. Shigematsu, and M. Kogure. 1998. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**:727–734.
- Navarro Robles J y Gómez Dantés H. 1995. *Salud Pública Méx.* **37**:113.
- Nielsen-LeRoux, C. & Charles, J. F. 1992. *Eur. J. Biochem.* **210**:585–590.
- Norma Oficial Mexicana de Emergencia (NOM-EM-2-001-SSA2-1999) para la vigilancia, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores.
- Ohana, B., J. Margalit, and Z. Barak. 1987. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:828–831.
- Ohba, M., and K. Aizawa. 1979. *J. Invertebr. Pathol.* **33**:387–388.
- Padua, L. E., M. Ohba, and K. Aizawa. 1984. *J. Invertebr. Pathol.* **44**:12–17.
- Padua, L. E., M. Ohba, and K. Aizawa. 1980. *J. Invertebr. Pathol.* **36**:180–186.
- Pardo-López, L., Gómez, I., Rausell, C., Sánchez, J., Soberón, M., and Bravo, A. 2006. *Biochemistry.* **45**: 10329–10336.
- Parker, M.W. y Feil, S.C. 2005. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **88**:91-124.
- Percy, J. and P.G. Fast. 1983. *J. Invertebr. Pathol.* **41**: 86-98.
- Petosa, C., Smith N. Corey, T. 1997. *Nature.* **385**:833–838.
- Pietrantonio, P.V. y S.S. Gill. 1996. *In: Biology of the insect midgut.* Chapman & Hall, Londres. **353-372**.
- Poncet, S., A. Delécluse, A. Klier, and G. Rapoport. 1995. *J. Invertebr. Pathol.* **66**:131–135.
- Porter, A. G., E. W. Davidson, and J.-W. Liu. 1993. *Microbiol. Rev.* **57**:838–861.
- Promdonkoy, B. & Ellar, D. J. 2005. *Mol. Membr. Biol.* **22**:327–337.
- Promdonkoy, B y Ellar, DJ. 2003. *Biochem. J.* **374**:255-259.
- Promdonkoy, B. & Ellar, D. J. 2000. *Biochem. J.* **350**:275–282.
- Promdonkoy, B. 1999. *Ph.D. Thesis.* Cambridge University, Cambridge, United Kingdom.
- Ptitsyn, O. B., R. H. Pain, G. V. Semisotnov, E. Zerovnik, and O. I. Razgulyaev. 1990. *FEBS Lett.* **262**:20–24.
- Pusztai, M., P. Fast, L. Gringorten, H. Kaplan, T. Lessard, and P. R. Carey. 1991. *Biochem. J.* **273**:43–47.
- Ragni, A., I. Thiéry, and A. Delécluse. 1996. *Curr. Microbiol.* **32**:48–54.
- Rajamohan, F., O. Alzate, J. A. Cotrill, A. Curtiss, and D. H. Dean. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**:14338–14343.
- Rashed, S. S., and M. S. Mulla. 1989. *J. Med. Entomol.* **26**:210–216.
- Rasko, D. A., M. R. Altherr, C. S. Han, and J. Ravel. 2005. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**:303–329.
- Rajamohan, F., Alzate, O., Cotrill, J. A., Curtiss, A. & Dean, D. H. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**:14338–14343.
- Rausell, C., Pardo-López, L., Sánchez, J., Muñoz-Garay, C., Morera, C., Soberón, M., and Bravo, A. 2004a. *J. Biol. Chem.* **279**: 55168–55175.
- Rausell, C., García-Robles, I., Sánchez, J., Muñoz-Garay, C., Martínez-Ramírez, A.C., Real, M.D., and Bravo, A. 2004b. *Biochem Biophys Acta.* **1660**: 99–105.

- Ravoahangimalala, O. & Charles, J.F. 1995. *FEBS Lett.* **362**:111–115.
- Ravoahangimalala, O., Charles, J.F. and J. Schoeller-Raccaud. 1993. *Res. Microbiol.* **144**:271–278.
- Regis, L., da Silva, S. B. & Melo-Santos, M. A. V. 2000. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **95**:207–210.
- Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MTR, Nogueira RMR & Travassos da Rosa. 1997. *Virology*. **230**:244-251.
- Rutstein S.O. 2000. Bulletin W H O. *Internal J. Public Health.* **78(10)**:1256-1270.
- Sangadala, S., F. S. Walters, L. H. English, and M. J. Adang. 1994. *J. Biol. Chem.* **269**:10088–10092.
- Said, AA and Ellar, DJ. 1995. *Microbiol.* **141**:3141-3148.
- Schnepf, E. Crickmore, N. Van rie J., Lereclus, D. Baum, J. Feitelson, J. Zeigler, DR. and Dean DH. 1998. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **62(3)**:775–806.
- Schnepf, H. E., K. Tomczak, J. P. Ortega, and H. R. Whiteley. 1990. *J. Biol. Chem.* **265**:20923–20930.
- Schwartz, J-L and Laprade, R. 2000. In: *Entomopathogenic bacteria. From laboratory to field application.* Kluwer Academic Publishers, London, **199-217**.
- Schwartz, J.L., Juteau, M., Grochulski, P., Cygler, M., Prefontaine, G., Brousseau, R., and Masson, L. 1997. *FEBS Lett.* **410**:397-402.
- Schwartz, J.-L., L. Garneau, D. Savaria, L. Masson, R. Brousseau, and E. Rousseau. 1993. *J. Membr. Biol.* **132**:53–62.
- Simons, K. and Toomre, D. 2000. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**:31-39.
- Slatin, S. L., C. K. Abrams, and L. English. 1990. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**:765–772.
- Smedley, D. P., and D. J. Ellar. 1996. *Microbiol.* **142**:1617–1624.
- Smith, G. P., and D. J. Ellar. 1994. *Biochem. J.* **302**:611–616.
- Soberón, M., Pardo-López, L., Gómez, I., López, I., Tabashnik, B. and Bravo, A. 2007. *Science*. In press.
- Soberón, M., Pérez, VR., Núñez-Valdéz, ME., Lorence, A., Gómez, Isabel., Sánchez, J. y Bravo, A. 2000. *FEMS Microbiol.* **191**:221-225.
- Strizhov, N., Séller, M., Konez-Kálmán, Z., Regev, A., Sneb, B., Schell, J., Konez, C. y A. Zilberstein. 1996. *Mol. Gen. Genet.* **253**:11-19.
- Tabashnik, B. E., Cushing, N. L., Finson, N. & Johnson, M. W. 1990. *J. Econ. Entomol.* **83**:1671–1676.
- Tabasnik, B. E. 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3343–3346.
- Takesue, S., K. Yokota, S. Miyajima, R. Taguchi, H. Ikezawa, and Y. Takesue. 1992. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **102**:7–11.
- Thomas, W. E., and D. J. Ellar. 1983a. *J. Cell Sci.* **60**:181–197.
- Thomas, W. E., and D. J. Ellar. 1983b. *FEBS Lett.* **154**:362-368.
- Tigue, N.J., Jacoby, J., and Ellar, D.J. 2001. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5715 5720.
- Tsiokas, L., Kim, E., Arnould, T., Sukhatme, V. P. & Walz, G. 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**:6965–6970.
- Usui, T., Y. Shima, Y. Shimada, S. Hirano, R. W. Burgess, T. L. Schwarz. M. Takeichi, and T. Uemura. 1999. *Cell.* **98**:585–595.
- van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele, and H. Van Mellaert. 1989. *Eur. J. Biochem.* **186**:239–247.
- Vadlamudi, R. K., E. Weber, I. Ji, T. H. Ji, and L. A. Bulla, Jr. 1995. *J. Biol. Chem.* **270**:5490–5494.

- Vadlamudi, R. K., T. H. Ji, and L. A. Bulla, Jr. 1993. *J. Biol. Chem.* **268**:12334–12340.
- Valaitis, A. P., J. L. Jenkins, M. K. Lee, D. H. Dean, and K. J. Garner. 2001. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **46**:186–200.
- Valeva, A., Weisser, A., Walker, B., Kehoe, M., Bayley, H., Bhakdi, S. and Palmer, M. 1996. *EMBO J.* **15(8)**:1857-1864.
- Vestal, D. J., and B. Ranscht. 1992. *J. Cell Biol.* **119**:451–46.
- Waalwijk, C., A. M. Dullemans, M. E. S. vanWorkum, and B. Visser. 1985. *Nucleic Acids Res.* **13**:8207–8217.
- Wabiko, H., Raymond, K.C. y A.L. Jr. Bulla. 1986. *DNA.* **5**:305-314.
- Wang, G. R., K. M. Wu, G. M. Liang, and Y. Y. Guo. 2005. *Sci. China Ser. C.* **48**:346–356.
- Wang, P., X. Zhang, and J. Zhang. 2005. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**:611–620.
- Ward, E. S., D. J. Ellar, and C. N. Chilcott. 1988. *J. Mol. Biol.* **202**:527–535.
- WHO. 1986. WHO Tech. Rep. Series (721). Geneva.
- Wirth, M. C., Park, H-W., Walton, W. E. & Federici, B. A. 2005. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:185–189.
- Wirth, M. C., Delécluse, A. y Walton, W.E. 2001. *Appl. Environ. Microbiol.* **67(7)**: 3280–3284.
- Wirth, M. C., Walton, W. E. & Federici, B. A. 2000a. *J. Med. Entomol.* **37**:401–407.
- Wirth, M. C., Federici, B. A. & Walton, W. E. 2000b. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1093–1097.
- Wirth, M. C., Georghiou, G. P. & Federici, B. A. 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**:10536–10540.
- Wolfersberger, M. G., X. J. Chen, and D. H. Dean. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:279–282.
- Wu, X., Vennison, S.J., Huirong, L., Ben-dov, E., Zaritsky, A. and Boussiba S. 1997. *Appl. Environ. Microbiol.* **63(12)**:4971-4975.
- Wu, S.J., and D. H. Dean. 1996. *J. Mol. Biol.* **255**:628–640.
- Wu, D., J. J. Johnson, and B. A. Federici. 1994. *Mol. Microbiol.* **13**:965–972.
- Wu, D. & Federici, B. A. 1993. *J. Bacteriol.* **175**:5276–5280.
- Wu, D. and F. N. Chang. 1985. *FEBS Lett.* **190**:232–236.
- Yamagiwa, M., Sakagawa, K. and Sakai, H. 2004. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**:523-528.
- Yamagiwa M, Ogawa R, Yasuda K, Natsuyama H, Sen K, Sakai H. 2002. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66(3)**:516-22.
- Yamagiwa, M., Esaki, M., Otake, K., Inagaki, M., Romano, T., Amachi, T. and Sakai H. 1999. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3464-3469.
- Yu, Y.M., M. Ohba, and S. S. Gill. 1991. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1075–1081.
- Yunovitz, H. y A. Yawetz. 1988. *FEBS Lett.* **230**:105-108.
- Zhang X, Candas M, Griko N.B., Taussig R y Bulla, L.A. 2006. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103(26)**: 9897–9902.
- Zhuang, M., Oltean, D.I., Gómez, I., Pullikuth, A.K., Soberón, M., Bravo, A., and Gill, S.S. 2002. *J. Biol. Chem.* **277**:13863–13872.