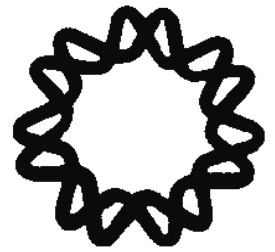




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

“Análisis de las regiones de interacción de las asas del dominio II de la toxina Cry4Ba con sus proteínas receptoras en *Aedes aegypti*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

I.B.Q. ESMERALDA Z. REYES FERNÁNDEZ.

DIRECTOR DE TESIS

DR. MARIO SOBERÓN CHÁVEZ.

CUERNAVACA, MOR.

MAYO 2010.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Esta tesis está dedicada con mucho amor y cariño a:

Mis padres, Cuauhtémoc Reyes y Ramona Fernández, quienes siempre me han apoyado en amplio sentido y han procurado que sea mejor persona día con día.

Mi hermana, Perla Citlali, por haber estado conmigo durante todo este trayecto en las buenas y en las malas, por darme la palabra precisa.

Christian, has sido y eres una persona muy importante para mí. Me has enseñado a ser fuerte en esta nueva etapa de mi vida y al mismo tiempo, me has ayudado a crecer enormemente. Eres realmente muy grande. Siempre te llevaré en mi corazón.

Esta tesis fue realizada bajo la asesoría del Dr. Mario Soberón Chávez, en el departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos

→**Dr. Mario Soberón y Dra. Alejandra Bravo**, mi más profundo respeto y admiración por su trabajo. Les agradezco enormemente su paciencia, el haber compartido sus conocimientos conmigo y el haberme guiado y corregido para la realización de un mejor trabajo. Sus consejos y su disposición en todo momento, los valoraré siempre.

→**Dr. Joel Osuna y Dr. Ricardo Grande**, muchas gracias por haberme apoyado con sus aportaciones y observaciones durante los cuatro tutorales presentados. Sus sugerencias fueron muy pertinentes y enriquecedoras para este trabajo.

→**Dr. Víctor Bustamante, Dr. Gerardo Corzo, Dr. Humberto Flores y Dr. Jesús Martínez**, gracias por tomarse el tiempo necesario para leer mi tesis, por hacerme correcciones, cuestionamientos y valiosas aportaciones.

→**Dra. Isabel Gómez**, por ser un gran ejemplo de fortaleza y dedicación a la ciencia. Gracias por ayudarme en todos mis cuestionamientos y por haber compartido tus experiencias técnicas conmigo. Estoy segura que aún llegarás más lejos.

→**Dr. Sabino Pacheco**, por enseñarme desde las cosas más básicas en biología molecular y bioquímica, hasta la manera de hacer mejor un experimento; por ser siempre muy accesible y por mostrarme ser un gran amigo en tan poco tiempo.

→**Dra. Claudia Rodríguez y Dr. Íñigo Ruiz**, por la gran asesoría que me brindaron en momentos de desesperación cuando los experimentos no fluían, por su amistad y por las grandes charlas que compartimos.

→**A mis amigos del laboratorio,**

Biviana, por haber compartido infinitas pláticas de todo y de nada, por haberme apoyado en momentos difíciles y haberme escuchado cuando lo necesité, eres una gran amiga; **Emiliano**, recuerdo que fuiste de las primeras personas que me sacó plática cuando llegué al laboratorio, tienes todo para hacerla en grande; **Iván**, sabes ser un gran amigo, muchas gracias por el llavero del león y por brindarme tu apoyo y ayuda cuando la necesité; **Josué**, eres una persona muy noble, servicial y un gran compañero de laboratorio; **Fernando**, aunque no platicamos mucho siempre pusiste a mi disposición tu material para transferencia electroforética, tu engrapadora y tus consejos para realizar mejor los ELISA's; **Dra. Helena**, por esas pláticas tan amenas que tuvimos de vez en vez y por haberme hecho aportaciones de mi trabajo durante los seminarios; **Ángeles**, te agradezco mucho tu buen humor y la vibra de felicidad que siempre esparciste en el laboratorio, fue crucial para liberar momentos de tensión por los experimentos fallidos; **Luis Enrique**, por esas pláticas entretenidas de panel a panel después de las 8 de la noche; **Ramiro**, por tu cordialidad, generosidad, sentido de la amistad y por incitarme a tomar el curso de redacción; **Raquel**, por tu enorme chispa, alegría y por tu gran entrega a tu profesión; **Gladys**, tienes una sonrisa muy contagiosa y sabes que me enamoré de tus botas; **Dra. Liliana**, por su accesibilidad dentro y fuera del laboratorio, sus comentarios fueron muy oportunos en mis experimentos; **Teresa**, me recibiste muy bien y me ayudaste con los primero experimentos que comencé a realizar; **Dr. Carlos**, por su disposición y ayuda; por cierto, los libros de francés me sirvieron bastante; **Leivi**, siempre te mostrarte muy accesible y amable conmigo cuando nos encontrábamos por los pasillos; **Nato**, porque compartimos día con día nuestras penas experimentales; **Betty y Moni**, porque siempre iluminaron el laboratorio con su risa; **Don Sergio**, por haberme preparado tantos geles, medios de cultivo y soluciones, su ayuda fue fundamental no sólo para mí sino par a todos los que laboramos en el lab; **Jorge**, por su gran asesoría técnica; **Liz**, por tenerme siempre listas las larvas de

Aedes aegypti y por asesorarme con Berlín; **Xóchitl**, por ayudarnos a todos con el material de trabajo y finalmente a **Chelita**, por apoyarme en los trámites o pedidos que realicé.

→A mis amigos no relacionados a este ámbito,

Evelia, Graciela y Aimée, porque a pesar de tantos años y tantas experiencias siempre han estado ahí; **Laura Olivia**, siempre has sabido qué decirme ante cualquier circunstancia y me has prestado tu hombro cuando lo he necesitado; **Hugo Alberto**, a pesar de todo has seguido procurándome en amplio sentido; **Dr. Francisco Delgado**, por su sabiduría y palabras de aliento; **Alexxa, Francia, Irene, Claudia, René, Memo y Edgar**, por su amistad y ejemplo de superación; **Luis Ariza**, por sus enormes enseñanzas de vida; **Dr. Francisco Sánchez**, por ayudarme a entenderme a mí misma; **Enrique**, por compartir tu enciclopedia mental conmigo; **Florence, Pavel, Fernando, Eduardo, Juan, Mercedes, Miguel, Gisel, Laura, Yolanda y Claret**, por enseñarme otra cara de la vida y compartir tantas risas en la clase de francés; **Mar, Maricela, Luis, Saraid, Roberto, Otto, Javier, José Ángel, Lesly y Krystel**, a pesar de que estamos lejos y pase el tiempo, la amistad ha continuado.

→**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

→**Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)**, por haberme abierto sus puertas para que pudiese realizar mis estudios de posgrado en el Instituto de Biotecnología, campus Cuernavaca, Morelos.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	4
1. RESUMEN	5
ABSTRACT	6
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
2.1.1 Características generales	7
2.1.2 <i>Bt</i> y su relación con otras bacterias del género <i>Bacillus</i>	8
2.1.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> subespecie <i>israelensis</i> (<i>Bti</i>)	9
2.2 δ -endotoxinas producidas por <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
2.2.1 δ -endotoxinas Cry	9
2.2.2 Estructura tridimensional de las toxinas Cry	11
→Dominio I	11
→Dominio II	11
→Dominio III	11
2.2.3 Moléculas receptoras de las toxinas Cry	13
→Aminopeptidasa N (APN)	13

→Caderina	14
→Fosfatasa alcalina (ALP)	14
→Glicolípido	15
→Otros receptores	15
2.2.4 Mecanismos de toxicidad de las toxinas Cry	16
2.2.5 δ - endotoxinas Cyt	18
2.3 <i>Aedes aegypti</i>, el mosquito causante del dengue y la fiebre de chinkungunya	19
2.3.1 Dengue	20
2.3.2 Fiebre de chinkungunya	21
2.3.3 Prevención y control	22
3. ANTECEDENTES PARTICULARES	24
3.1 Toxinas Cry	24
3.1.1 Mutaciones en el asa 1 y 2 del dominio II de la toxina Cry4Ba, redujeron la actividad contra <i>Aedes aegypti</i> .	24
3.1.2 Mutaciones en las regiones de las asas del dominio II de la toxina Cry19Aa incrementaron su actividad contra <i>Aedes aegypti</i> .	24
3.1.3 Mutagénesis dirigida de la toxina Cry4Ba en los residuos de las asas del dominio II afecta la actividad larvicida.	25
3.1.4 La toxina Cry1Aa fue rediseñada para ser capaz de tener especificidad contra mosquitos.	25

3.2 Sinergismo entre las toxinas Cry y Cyt de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	26
3.3 Receptor fosfatasa alcalina	27
3.3.1 La fosfatasa alcalina de <i>Aedes aegypti</i> es una proteína de unión importante para la toxina Cry4Ba	27
3.3.2 El asa α -8 y el asa 3 del dominio II de Cry11Aa, son regiones involucradas en la unión al receptor en <i>Aedes aegypti</i> .	28
3.3.3 La Fosfatasa Alcalina anclada a la membrana del intestino de <i>Aedes aegypti</i> por GPI (glicosilfosfatidilinositol), es un receptor que interactúa con la toxina Cry11Aa.	28
3.4 Receptor caderina	29
3.4.1 La caderina AgCad1 de <i>Anopheles gambiae</i> une a la toxina Cry4Ba de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> .	29
3.4.2 La caderina de <i>Aedes aegypti</i> sirve como receptor putativo de la toxina Cry11Aa de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> .	29
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
5. HIPÓTESIS	32
6. OBJETIVO GENERAL	32
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	33
8.1 Construcción de péptidos sintéticos.	34
8.2 Competencia de péptidos sintéticos por la unión de la toxina Cry4Ba a la ALP1.	34

8.3	Construcción de mutantes.	34
8.4	Bioensayos a las larvas de <i>Aedes aegypti</i> .	34
8.5	Ensayos de unión.	35
9.	MATERIALES Y MÉTODOS	36
9.1	Soluciones y medios de cultivo.	36
9.2	Cepas utilizadas.	37
9.3	Purificación de la protoxina Cry4Ba, Cry11Aa y Cyt1Aa.	37
9.4	Solubilización y activación de las toxinas Cry4Ba, Cry11Aa y Cyt1Aa.	38
9.5	Expresión y purificación de la fosfatasa alcalina recombinante (ALP1).	39
9.6	Expresión y purificación de los fragmentos de caderina de <i>Aedes aegypti</i> :	
	C13, G7 y G10.	40
9.7	Ensayo de la unión Cry4Ba-ALP1 mediante la prueba de ELISA	41
9.8	Ensayo de competencia de los péptidos sintéticos por la unión Cry4Ba-ALP1	
	(unión a ligando).	41
9.9	Mutagénesis sitio dirigida.	45
9.10	Tranformación de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	47
9.11	Análisis de las mutantes de Cry4Ba.	48
9.12	Análisis de la solubilización y activación de las mutantes de Cry4Ba.	49
9.13	Bioensayos a las larvas de <i>Aedes aegypti</i> .	49
9.14	Preparación de las vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA).	50

9.15 Ensayo de unión tipo Bosch de la Cry4Ba y sus mutantes a las VMMA´s.	50
9.16 Análisis de la unión de Cry4Ba y sus mutantes a la ALP1 mediante ensayo de unión a ligando.	52
9.17 Análisis de la unión de Cry4Ba y sus mutantes a la ALP1 mediante ELISA.	52
9.18 Análisis de la unión de Cry4Ba a los fragmentos de caderina C13, G7 y G10 de <i>Aedes aegypti</i> .	52
9.19 Unión de Cry4Ba al fragmento G10 de la caderina de <i>Aedes aegypti</i> mediante prueba de ELISA.	53
9.20 Unión de Cry4Ba a la Cyt1Aa (ELISA).	53
9.21 Análisis de la unión de Cry4Ba a Cyt1Aa (ELISA).	53
9.22 Análisis de Cry4Ba y sus mutantes a Cyt1Aa (ELISA).	53
10. RESULTADOS	54
10.1 Purificación, solubilización y activación de Cry4Ba, Cry11Aa y Cyt1Aa.	54
10.2 Expresión de la fosfatasa alcalina (ALP1).	55
10.3 Purifiación de la ALP1.	56
10.4 Expresión y purificación de los fragmentos de caderina C13, G7 y G10 de <i>Aedes aegypti</i> .	56
10.5 Unión de Cry4Ba a la ALP1 mediante ELISA.	57
10.6 Ensayo de competencia de los péptidos sintéticos por la unión Cry4Ba-ALP1 (unión a ligando).	58
10.7 Mutagénesis sitio dirigida.	62
10.8 Análisis de la solubilización y activación de las mutantes de Cry4Ba.	64

10.9 Bioensayos de las larvas de <i>Aedes aegypti</i> de 4to. Instar.	66
10.10 Ensayo de unión de la toxina Cry4Ba y sus mutantes a las VMMA´s de <i>Aedes aegypti</i> .	67
10.11 Unión de Cry4Ba y sus mutantes a la ALP1 (ELISA y ensayo de unión a ligando).	68
10.12 Unión de Cry4Ba a los fragmentos de caderina C13, G7 y G10 de <i>Aedes aegypti</i> .	70
10.13 Unión de Cry4Ba y sus mutantes al fragmento G10 de caderina.	72
10.14. Unión de la Cry4Ba a la Cyt1Aa.	74
10.15 Unión de la Cry4Ba y sus mutantes a la Cyt1Aa (ELISA).	
11. DISCUSIÓN	77
12. CONCLUSIONES	82
13. PERSPECTIVAS	83
14. REFERENCIAS	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microfotografía de <i>Bacillus thuringiensis</i> en microscopio electrónico de transmisión.	7
Figura 2. Filograma de identidades entre las secuencias Cry.	10
Figura 3. Representación de la estructura tridimensional de la toxina Cry4Ba con sus tres dominios.	12
Figura 4. Moléculas receptoras para proteínas Cry1A.	15
Figura 5. Longitud relativa de las protoxinas Cry y posición de la digestión de las proteasas.	16
Figura 6. Mecanismo de acción propuesto de las toxinas Cry en lepidópteros.	17
Figura 7. Estructura tridimensional de la proteína cristal citotóxica Cyt2Ba.	19
Figura 8. Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> .	
Figura 9. Mosquito <i>Aedes aegypti</i> en su fase adulta.	21
Figura 10. Sinergismo de las toxinas Cyt1Aa-Cry11Aa.	27
Figura 11. Diagrama descriptivo de la estrategia experimental.	33
Figura 12. Representación esquemática del ensayo de ELISA	42
Figura 13. Representación esquemática de la transferencia a membrana de la toxina Cry4Ba.	43
Figura 14. Ensayo de competencia de los péptidos sintéticos por la unión Cry4Ba-ALP1.	44
Figura 15. Esquema de la mutagénesis sitio dirigida.	45
Figura 16. Representación esquemática del experimento de unión de la toxina Cry4Ba a las VMMA de <i>Aedes aegypti</i> .	51
Figura 17. Activación de Cry4Ba, Cry11Aa y Cyt1Aa.	54

Figura 18. Expresión de la ALP1 inducida mediante 1mM de IPTG en células de <i>E. coli</i> ER2566	55
Figura 19. Purificación de la ALP1 mediante la utilización de una columna Ni-agarosa.	53
Figura 20. Expresión y purificación de los fragmentos de caderina de <i>A. aegypti</i> : C13, G7 y G10	57
Figura 21. Curva de saturación de la unión Cry4Ba-ALP1	58
Figura 22. Estructura tridimensional de la toxina Cry4Ba mostrando sus tres dominios.	59
Figura 23. Ensayo de competencia de los péptidos sintéticos por la unión Cry4Ba-ALP1.	62
Figura 24. Representación de la construcción de las mutantes de Cry4Ba.	63
Figura 25. Gel de agarosa al 2% que muestra la incorporación del plásmido con la mutación deseada a la cepa acristalífera de <i>Bacillus thuringiensis</i> serotipo1-407.	64
Figura 26. SDS-PAGE al 12% teñido con Coomassie que muestra la solubilización de Cry4Ba y sus mutantes.	65
Figura 27. SDS-PAGE al 12% teñido con Coomassie que muestra la activación de Cry4Ba y sus mutantes.	65
Figura 28. Ensayo de unión tipo Bosch para ver la unión de Cry4Ba y sus mutantes a las VMMA´s.	68
Figura 29. Ensayo de unión de Cry4Ba y sus mutantes a la ALP1 mediante prueba de ELISA.	69
Figura 30. Ensayo de unión a ligando de Cry4Ba y sus mutantes a la ALP1.	70
Figura 31. Representación esquemática de la caderina de <i>Aedes aegypti</i> .	71
Figura 32. Unión de la Cry4Ba a los fragmentos de caderina de <i>Aedes aegypti</i> : C13,G7 y G10	72
Figura 33. Curva de saturación de la unión Cry4Ba-fragmento G10 de la caderina de <i>Aedes aegypti</i> mediante ELISA.	73

Figura 34. Unión de Cry4Ba y sus mutantes al fragmento G10 mediante la prueba de ELISA.	74
Figura 35. Curva de saturación de la unión Cry4Ba-Cyt1Aa mediante prueba de ELISA.	75
Figura 31. Unión de Cry4Ba y sus mutantes a la Cyt1Aa mediante prueba de ELISA.	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos correspondientes a las asas 2 y $\alpha 8$ de Cry4Ba a mutagenizar.	45
Tabla 2. Concentración de los componentes utilizados en la mutagénesis sitio dirigida de Cry4Ba.	46
Tabla 3. Condiciones utilizadas en la mutagénesis sitio dirigida de Cry4Ba.	46
Tabla 4. Concentración de los componentes utilizados en la PCR de colonia de las mutantes de Cry4Ba obtenidas.	48
Tabla 5. Condiciones del PCR colonia de las mutantes de Cry4Ba obtenidas.	49
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en el PCR colonia de las mutantes de Cry4Ba obtenidas.	49
Tabla 7. Péptidos sintéticos correspondientes a las asas expuestas del dominio II de Cry4Ba.	60
Tabla 8. LC_{50} de la toxina Cry4Ba silvestre y de sus mutantes L2M1, L2M2, L2M3, L2M4, $\alpha 8M1$ y $\alpha 8M2$.	66
Tabla 9. Descripción de los fragmentos: C13, G7 y G10 de caderina de <i>A. aegypti</i> .	71

LISTA DE ABREVIATURAS

2xTY	Medio rico de crecimiento.
ALP	Fosfatasa alcalina.
ALP1	Fosfatasa alcalina recombinante.
APN	Aminopeptidasa N.
BSA	Albúmina Sérica Bovina.
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i> .
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> subespecie <i>israelensis</i> .
Bt-R1	Caderina de <i>Manduca sexta</i> .
Bt-R175	Caderina de <i>Bombyx mori</i> .
CR	Repetido de caderina.
C13	Repetido de caderina de <i>Aedes aegypti</i> que posee CR3 y CR4-7.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético.
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético.
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.
G7	Repetido de caderina de <i>Aedes aegypti</i> que posee CR1-4 y parte de CR5.

G10	Repetido de caderina de <i>Aedes aegypti</i> que posee parte de CR7 y CR8-11.
GPI	Glicosilfosfatidilinositol.
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactósido.
LB	Medio de crecimiento Luria-Bertani.
PBS	Solución amortiguadora fosfato salina.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PI-PLC	Fosfolipasa C fosfatidilinositol específica.
PMSF	Fluoruro de metilfenilsulfonil.
PVDF	Polifluoruro de vinilideno.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida.
SOC	Medio superóptimo de crecimiento, adicionado con glucosa.
SP	Medio mínimo de esporulación.
Trx	Tiorredoxina.
VMMA	Vesículas de membrana de la microvellosidad apical.

1. RESUMEN

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* (*Bti*), una bacteria Gram-positiva formadora de esporas, es altamente tóxica contra larvas de dípteros. Durante su fase de esporulación *Bti* produce, al menos, 4 inclusiones cristalinas de naturaleza proteínica: Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa y Cyt1Aa. La toxina Cry4Ba de 130kDa presenta un poder insecticida muy fuerte contra larvas de mosquito de las especies de *Aedes* y *Anopheles*, los cuales son transmisores del virus del dengue y del parásito de la malaria, respectivamente.

En general, se ha visto que las asas del dominio II de las toxinas Cry son importantes para su interacción con sus moléculas blanco en insectos susceptibles.

En el presente estudio, se analizaron las regiones de las asas del dominio II de la toxina Cry4Ba que pudiesen estar involucradas en la unión con sus moléculas receptoras en *Aedes aegypti*: fosfatasa alcalina y caderina; además de su unión a Cyt1Aa.

Mediante el uso de péptidos sintéticos correspondientes a las asas expuestas del dominio II de la toxina Cry4Ba (asa 1, asa 2, asa 3 y asa $\alpha 8$) se realizaron ensayos de competencia por la unión Cry4Ba a la fosfatasa alcalina (ALP1). Con los datos obtenidos, se decidió realizar mutagénesis dirigida al sitio de las asas 2 y $\alpha 8$ mediante el intercambio de regiones cortas de aminoácidos por alaninas: **L2M1** (383AAATSSPSNRVTKM396), **L2M2** (383ITDAAAPSNRVTKM396), **L2M3** (383ITDTSSAAARVTKAM396), **L2M4** (383ITDTSSPSNAAAAM396), **$\alpha 8$ M1** (300AAASIAALE308), **$\alpha 8$ M2** (300SSKAAAALE308) y **$\alpha 8$ M3** (300SSKSIAAAA308).

En bioensayos realizados con larvas de *Aedes aegypti* se observó que las mutantes L2M2, L2M3, L2M4 y $\alpha 8$ M2 redujeron su toxicidad (2.2, 5.7, 9.6 y 1.9 veces, respectivamente). Estos datos correlacionaron con los ensayos de unión a caderina, fosfatasa alcalina y Cyt1Aa, donde las mismas mutantes se vieron afectadas. Estos resultados sugieren que ambas asas, 2 y $\alpha 8$, son esenciales para la interacción con caderina, fosfatasa alcalina y Cyt1Aa.

1. ABSTRACT

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* (*Bti*), a Gram-positive spore-forming bacterium, is highly toxic to dipteran larvae. During sporulation, *Bti* produces at least four major types of mosquitocidal crystal proteins, which are Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa and Cyt1Aa. The 130kDa Cry4Ba toxin is highly poisonous to the mosquito larvae of *Aedes* and *Anopheles* species, which transmit dengue viruses and malarial parasites, respectively.

In general, the loops of domain II of Cry toxins are important for the interaction with their receptors in their target insects.

The present study explored the regions of domain II of Cry4Ba toxin that are involved in binding with their receptors: alkaline phosphatase and cadherin in *Aedes aegypti* larvae, besides binding to Cyt1Aa.

By using synthetic peptides that correspond to the exposed regions in domain II of Cry4Ba toxin (loop1, loop2, loop3 and loop α -8) we did competition binding assays of these peptides in the presence of Cry4Ba to the alkaline phosphatase (ALP1). We identified two regions that could be involved in binding, loop2 and loop α -8. Then we did amino acid substitutions (alanine scanning) in loops 2 and α -8 by site directed mutagenesis: L2M1 (383AAATSSPSNRVTKM396), L2M2 (383ITDAAAPSNRVTKM396), L2M3 (383ITDTSSAAARVTKAM396), L2M4 (383ITDTSSPSNAAAAM396), α 8M1 (300AAASIAALE308), α 8M2 (300SSKAAAAL308) and α 8M3 (300SSKSIAAAA308).

Bioassays performed on larvae of *Aedes aegypti* showed that the mutants L2M2, L2M3, L2M4 and α 8M2 were less toxic (2.2, 5.7, 9.6 and 1.9 times, respectively). These data correlated with cadherin, alkaline phosphatase and Cyt1Aa binding assays, where the same mutants were affected. These results suggest that loop2 and loop α 8 are essential for interaction with cadherin, alkaline phosphatase and Cyt1Aa.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Bacillus thuringiensis*

2.1.1 Características generales

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta y formadora de esporas, que durante su ciclo de vida presenta dos fases principales: **crecimiento vegetativo**, donde las bacterias se duplican por bipartición; y **esporulación**, un programa de diferenciación de bacteria a spora. Durante la esporulación, *Bt* produce proteínas insecticidas en forma de inclusiones citoplasmáticas (Fig.1), las cuales llegan a ser específicamente tóxicas para diversos órdenes de insectos, incluyendo: **Diptera** (mosquitos y moscas), **Lepidóptera** (mariposas y palomillas), **Coleóptera** (escarabajos) e **Himenóptera** (abejas y avispas) (Angsuthanasombat *et al.*, 1992). Las *Bt* δ -endotoxinas pueden ser clasificadas en dos familias con base a su identidad de secuencia aminoacídica: **Cry** y **Cyt** (Angsuthanasombat *et al.*, 1993).

Los genes que codifican para las proteínas insecticidas se localizan en plásmidos, los cuales generalmente están flanqueados por elementos transponibles. De esta manera, la diversidad de las cepas de *Bt* está dada en gran parte por un alto grado de variabilidad genética (Crickmore *et al.*, 1998). La cantidad de proteína-cristal producida por un cultivo de *Bt* en condiciones de laboratorio (aproximadamente 0.5mg de proteína/mL) y el tamaño de sus cristales indican que cada célula tiene que sintetizar de 10^6 a 2×10^6 moléculas de δ -endotoxina durante la fase estacionaria para formar el cristal. Esto significa que presenta una producción masiva de estas proteínas, ocupando presumiblemente una gran porción de la maquinaria celular para su síntesis (Du, 1994).

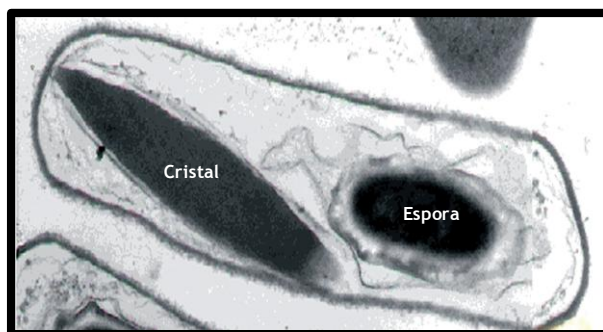


Figura 1. Microfotografía de *Bacillus thuringiensis* en microscopio electrónico de transmisión. Se muestra el cristal proteínico romboide compuesto de toxinas Cry y una espora en proceso de formación (de Maagd *et al.*, 2001).

2.1.2 *Bt* y su relación con otras bacterias del género *Bacillus* y otras especies

El género *Bacillus* incluye numerosas especies como: *B. alvei*, *B. amyloliquefaciens*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. globigii*, *B. infernus*, *B. larvae*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mucilaginosus*, *B. natto*, *B. polymyxa*, *B. pseudoanthracis*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. sporothermodurans*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* y por supuesto, *B. thuringiensis*.

A nivel de genoma *Bt* está muy relacionado con *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*, de modo que se pueden considerar como parte de un mismo grupo. La diferencia principal entre estas bacterias es la información genética codificada en cada uno de sus plásmidos. En el caso de *Bt* hay plásmidos que codifican proteínas cristalinas con características insecticidas, mientras que *B. anthracis*, un patógeno para humanos y animales, posee dos plásmidos monocopia que codifican para los factores de virulencia. *B. cereus*, un patógeno humano oportunista, ocupa el mismo nicho ecológico que *Bt*, pero no produce cristales.

Bacillus sphaericus es una bacteria que llega a ser tóxica contra insectos dípteros, característica que le es atribuida por la presencia de una toxina binaria (BinA/BinB), la cual se acumula en inclusiones cristalinas durante la esporulación. Existen cepas que no producen cristales; sin embargo, conservan su toxicidad debido a la presencia de proteínas tipo soluble (Mtx) producidas durante la fase vegetativa del crecimiento celular.

Paenibacillus popilliae es una bacteria tóxica hacia larvas de coleópteros, específicamente hacia el escarabajo Japonés, contra el cual ha sido empleado como agente de control durante más de 50 años (Koppenhöfer *et al.*, 2000). Este coleóptero constituye una plaga de importancia en el este de los Estados Unidos donde el empleo de químicos está regulado estrictamente. El efecto tóxico de *P. popilliae* ha sido atribuido a proteínas contenidas dentro de inclusiones cristalinas parasporales semejantes a las toxinas Cry de *Bt* (Zhang *et al.*, 1997).

Por último, *Brevibacillus laterosporus* y algunas cepas de *Clostridium bifermentans* producen cristales que le confieren toxicidad hacia insectos dípteros (Smirnova *et al.*, 1996). Las toxinas cristalinas producidas por estas bacterias poseen un gran parecido con las toxinas Cry16 y Cry17 de *Bt* con actividad hacia *A. aegypti*.

2.1.3 *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* (*Bti*)

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* (*Bti*) es altamente tóxica contra diferentes especies de mosquitos vectores de enfermedades humanas como: *Aedes spp.*, *Culex spp.*, y *Anopheles spp.* (Margalith y Ben-Dov, 2000). Esta bacteria produce inclusiones cristalinas formadas por las toxinas **Cry4Aa**, **Cry4Ba**, **Cry10Aa**, **Cry11Aa**, **Cyt1Aa** y **Cyt2Ba** (Porter *et al.*, 1993).

Se ha visto que el empleo de *Bti* en campo no genera poblaciones de insectos resistentes (Guillet *et al.*, 1990; Regis *et al.*, 2000) en contraste con lo reportado respecto al uso de *Bacillus sphaericus*. Se propone que el hecho de *Bti* cuente con dos tipos de toxinas con mecanismos de acción diferentes (Cry y Cyt), es lo que ha contribuido a la baja aparición de insectos resistentes a esta bacteria. En este sentido se ha propuesto que la toxina Cyt1Aa sinergiza la acción de las toxinas Cry contenidas en el cristal.

2.2 δ -endotoxinas producidas por *Bacillus thuringiensis*

2.2.1 δ -endotoxinas Cry

Se dice que una proteína Cry es un polipéptido de *Bt* que forma inclusiones parasporales proteínicas, las cuales presentan efectos tóxicos experimentalmente verificables sobre un organismo susceptible, o bien una proteína que posee una similitud de secuencia obvia con alguna proteína Cry (Crickmore *et al.*, 1998). A la fecha, las proteínas Cry están distribuidas en 50 grupos y varios subgrupos. Cada grupo muestra una especificidad muy alta hacia cierto tipo de insectos. En la figura 2, se muestra un filograma de las toxinas Cry descritas a la fecha. Las líneas verticales representan los límites en identidad que marcan las diferentes categorías en la nomenclatura. El número arábigo que se designa con la primera fila corresponde hasta 45% de identidad (por ejemplo: Cry1, Cry2, etc). La segunda hilera, cataloga a las proteínas con una letra mayúscula y corresponde a identidades de 45 a 78% (Cry1A, Cry1B, etc.). La tercera fila asigna una letra minúscula y corresponde a identidades de 78 a 95% (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, etc.). La última fila incluye un número arábigo al final de la nomenclatura indicando más del 95% de identidad (Cry1Aa1, Cry1Aa2, etc.) (Crickmore *et al.*, 1998; De Maagd *et al.*, 2001). El grupo mayoritario de las toxinas Cry se les conoce como la familia de tres dominios, y estos son explicados en breve.

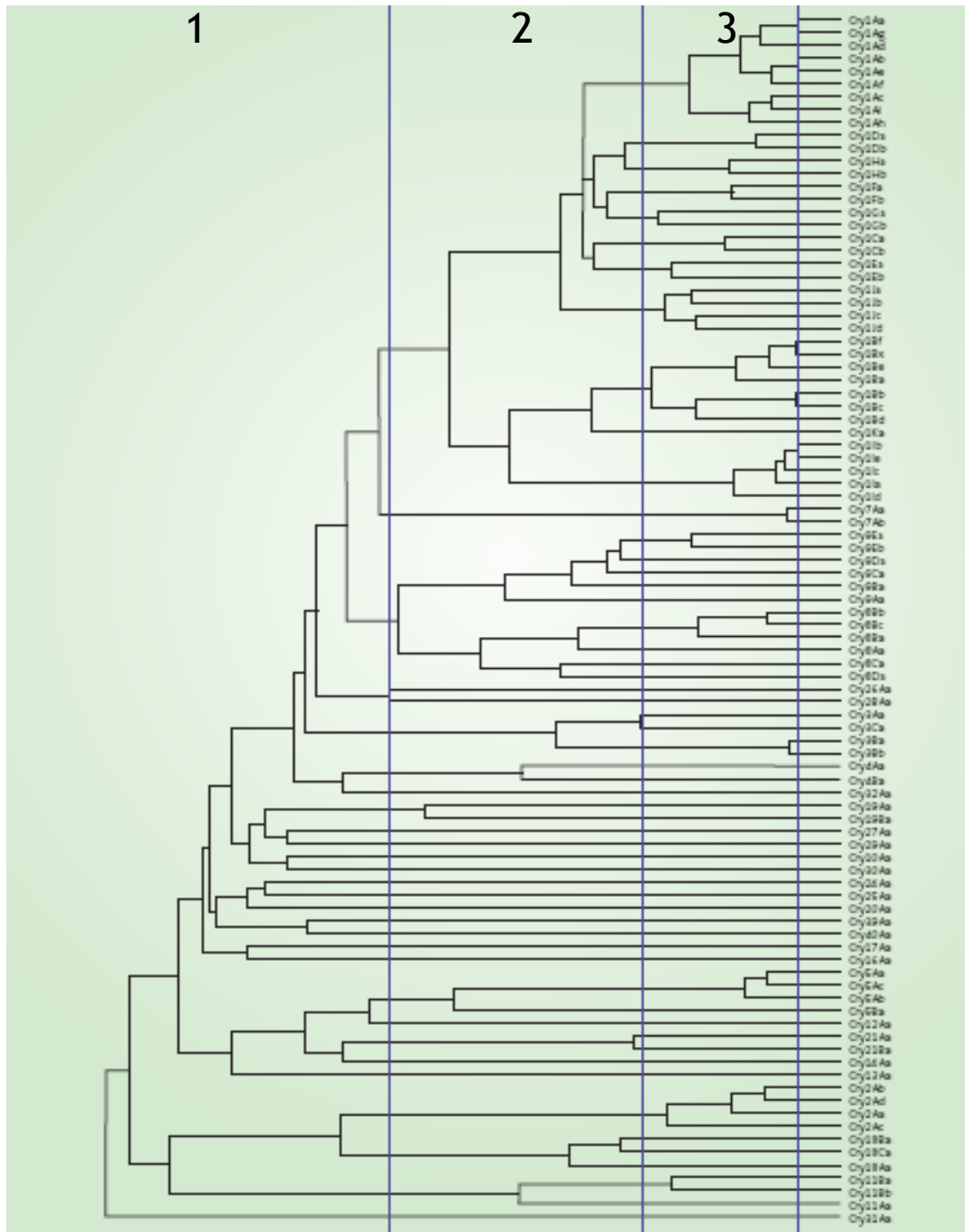


Figura 2. Filograma de identidades entre las secuencias Cry . Las líneas verticales denotan los niveles de la nomenclatura.
Tomado y adaptado de http://www.biols.susx.ac.uk./home/Neil_Crickmore/Bt/.

2.2.2 Estructura tridimensional de las toxinas Cry

Hasta ahora se han resuelto, mediante cristalografía de rayos X, la estructura tridimensional de siete toxinas Cry de tres dominios: Cry1Aa, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry4Aa y Cry4Ba.

A pesar de que estas toxinas muestran diferencias significativas tanto en su secuencia de aminoácidos como en la especificidad contra los insectos, todas ellas presentan una estructura tridimensional muy similar, la cual está conformada por tres dominios. Cada uno de estos dominios es descrito a continuación de manera general.

→Dominio I.-

El dominio I se describió originalmente en la toxina Cry3Aa por Li y colaboradores (1991). Éste consiste de siete α -hélices de naturaleza anfipática, seis de las cuales rodean a la hélice más hidrofóbica ($\alpha 5$). La mayoría de las hélices llegan a ser mayores de 30 Å, lo cual les permite ser capaces de insertarse a la membrana, de ahí que se le reconozca a este dominio su participación en la formación de poro (Li *et al.*, 1991). Se ha visto las similitudes estructurales con otras toxinas formadoras de poro como: la colicina (Fig. 3), hemolisina E y el dominio de translocación de membrana de la toxina de la difteria.

→Dominio II.- Este dominio es el responsable de la alta variabilidad entre las toxinas Cry. Está constituido por tres láminas β antiparalelas (formando un β -prisma) y por cuatro asas expuestas (Li *et al.*, 1991). Por estudios de mutagénesis en estas asas, se ha constatado el papel fundamental del dominio II en el reconocimiento y unión a su receptor (Fernández *et al.*, 2005).

La estructura del dominio II ha sido comparado con otras proteínas del tipo β -prisma como: la lectina de *Helianthus tuberosus* (Bourne *et al.*, 1999) y la aglutinina de *Maclura pomífera* (Lee *et al.*, 1998) (Fig. 3).

→Dominio III.- Forma una estructura tipo emparedado β . En este arreglo, dos láminas β antiparalelas se empaquetan para formar una estructura “jelly roll”.

Se ha visto que el dominio III presenta menos variabilidad estructural que el dominio II, y las principales diferencias se encuentran en las longitudes, orientaciones y secuencias de las asas (Grochulski *et al.*, 1995).

El dominio III se ha comparado con diversas proteínas y se le ha atribuido similitud con las moléculas de unión a carbohidratos encontradas en hidrolasas, liasas y esterasas de microorganismos (de Maagd *et al.*, 1999) (Fig. 3).

A este dominio se le relaciona con la unión al receptor. Con diferentes toxinas Cry1, empleando como modelos blanco a *M. sexta* (de Maagd *et al.*, 1999) y *Spodoptera exigua* (de Maagd *et al.*, 2000), se demostró que este dominio tiende a ser de relevancia en la unión al receptor, ya que el intercambio de este dominio cambia la especificidad de estas toxinas.

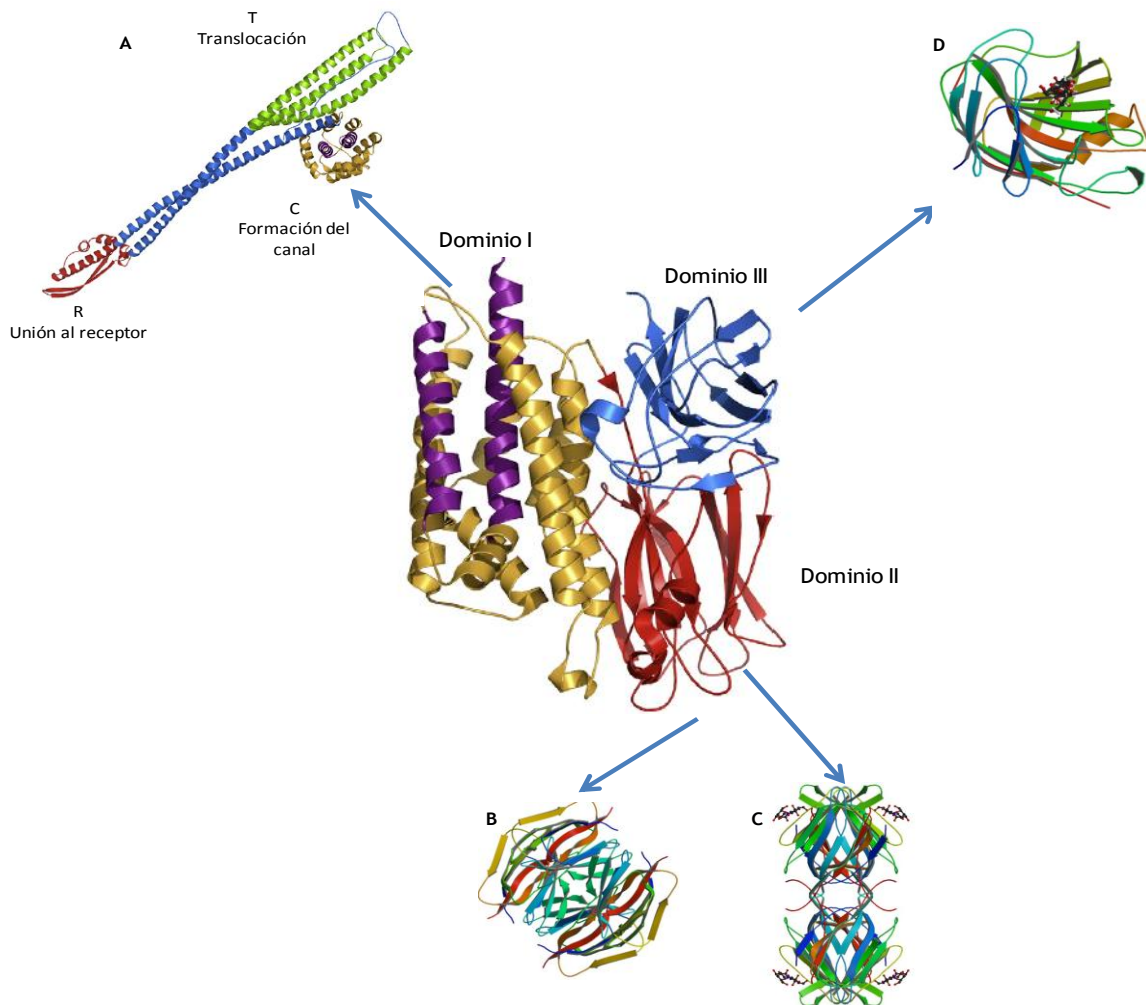


Figura 3. Representación de la estructura tridimensional de la toxina Cry4Ba con sus tres dominios. En cada dominio se señalan algunas proteínas con las que se les ha relacionado por presentar una estructura semejante. (A) El dominio I de Cry4Ba es comparado con el dominio C de la colicina (dominio formador del poro). (B) Lectina de *Helianthus tuberosus*. (C) Aglutinina de *Maclura pomifera*. B y C son consideradas como proteínas beta-prisma. (D) Complejo de endoglucanasa con trímero de glucosa modificado de *Streptomyces lividans* comparte la estructura de “jelly roll” del dominio III de Cry4Aa.

2.2.3 Moléculas receptoras de las toxinas Cry

La unión de las toxinas Cry a las moléculas receptoras, encontradas en el epitelio intestinal del insecto, es un determinante importante de la especificidad. La correlación entre la unión y la toxicidad fue demostrada en un principio usando vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA), preparadas a partir de la microvellosidad, mediante la técnica desarrollada por Wolfersberger.

Después de que se demostró que en el intestino del insecto existían sitios de unión afines a la toxina y altamente específicos, se intensificaron los esfuerzos para identificar y clonar los receptores de estas toxinas Cry. A la fecha, se han reportado diversos receptores para toxinas Cry, de los cuales los mejores caracterizados son los receptores aminopeptidasa N (APN) (Gill *et al.*, 1995; Knight *et al.*, 1994; Rajagopal *et al.*, 2003; Sangadala *et al.*, 1994) y los receptores tipo caderina identificados en lepidópteros (Gahan *et al.*, 2001; Nagamatsu *et al.*, 1998; Vadlamudi *et al.*, 1993; Vadlamudi *et al.*, 1995). En nemátodos, se piensa que los glicolípidos son una clase importante de receptores de toxinas Cry (Griffitts *et al.*, 2005). Otros receptores putativos incluyen: alcalino fosfatasa (ALPs) (Fernández *et al.*, 2006; Jurat-Fuentes *et al.*, 2004; Jurat-Fuentes *et al.*, 2006), un glicoconjugado de 270 kDa (Valaitis *et al.*, 2001) y una proteína de 252 kDa (Hossain *et al.*, 2004).

→ Aminopeptidasa (APN)

La familia de las APN es una clase de enzimas que corta los aminoácidos neutrales del N terminal de los polipéptidos. Tienen una variedad de funciones en un amplio rango de especies, pero en intestinos de larvas de lepidópteros, ellos trabajan en cooperación con endopeptidasas y carboxipeptidasas para digerir proteínas derivadas de la dieta del insecto (Wang *et al.*, 2005).

Existen diversos criterios de clasificación de estas proteínas como: por el número de aminoácidos cortados en el N-terminal de los sustratos, con respecto a la eficiencia relativa con la cual los residuos son removidos, con respecto a la localización de la aminopeptidasa, por su susceptibilidad a la inhibición por bestatina, de acuerdo al contenido del ion metálico y/o los residuos que unen el metal a la enzima o de acuerdo al pH en el que la actividad máxima es observada.

Las aminopeptidasas también son reconocidas por ser receptores putativos de las toxinas Cry. En *Manduca sexta* se observó la unión de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac a una APN de 120 kDa

(Masson *et al.*, 1995). Posteriormente se observó la unión de Cry1C a otra APN de 106 kDa en ese mismo insecto lepidóptero (Luo *et al.*, 1996). El primer reporte en dípteros de una APN como proteína de unión a Cry, es el de *Anopheles quadrimaculatus*, cuya APN de 100 kDa une la toxina Cry11Ba (Abdullah *et al.*, 2006).

→ Caderina

Las superfamilia de caderinas es muy diversa y presenta una variedad de funciones: adhesión celular, migración, organización del citoesqueleto y morfogénesis (Angst *et al.*, 2001; Gumbiner, 1996).

Las proteínas caderinas fueron identificadas como proteínas de unión de la toxina Cry1A en *Manduca sexta* (Vadlamudi *et al.*, 1995) y posteriormente, demostraron estar involucradas en la unión y toxicidad en especies lepidópteras como: *Bombyx mori* (Nagamatsu *et al.*, 1998), *H. virescens* (Gahanm *et al.*, 2001), *Helicoverpa armigera* (Xu *et al.*, 2005), *Pectinophora gossypiella* (Morin *et al.*, 2003), *Ostrinia nubilalis* (Flannagan *et al.*, 2005) y más recientemente en el díptero *Aedes aegypti* (Chen *et al.*, 2009).

Las caderinas de insectos son proteínas modulares compuestas de tres dominios: el ectodominio C formado por 11 a 12 repetidos de caderina, el dominio transmembranal y el dominio intracelular (Vadlamudi *et al.*, 1995). En contraste a las caderinas de vertebrados que están involucradas en contactos intercelulares y están localizados en la membrana basolateral, en larvas de *M. sexta* y *A. gambiae* se observó a las caderinas localizadas en las células epiteliales del intestino (el sitio de acción de las toxinas Cry) (Chen *et al.*, 2009).

→ Fosfatasa alcalina (ALP)

Las fosfatasas alcalinas también han sido identificadas como receptores de las toxinas Cry. En estudios previos se ha sugerido que ALP actúa como receptor de la Cry1Aa en *M. sexta* (Mc Nall *et al.*, 2003; Sangadala *et al.*, 1994) y *H. virescens* (Jurat-Fuentes *et al.*, 2005), de la misma forma que lo es para la Cry11Aa en *Aedes aegypti* (Fernández *et al.*, 2006). Finalmente, en *Anopheles stephensi* se encuentran dos proteínas de unión a las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba, con pesos moleculares de 65 y 57KDa, una de las cuales presenta actividad de fosfatasa alcalina (Dronina, *et al.*, 2006; Fernández, *et al.*, 2009).

→ **Glicolípido**

Los glicolípidos son otra clase importante de receptores de toxinas Cry. Su relevancia se demostró en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*; ya que las mutantes de *C. elegans* que eran resistentes a la toxina Cry5A tenían mutaciones en genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de glicolípidos (Griffits, *et al.*, 2005).

En la figura 4 se muestran los receptores identificados para la toxina Cry1A.

→ **Otros receptores**

Estudios preliminares sugieren que las toxinas Cry pueden unirse a dos tipos de receptores adicionales. El primero, un glicoconjugado de 270kDa aislado de *Limantria dispar* llamado BTR-270, se observó que unía fuertemente a Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ba, débilmente a Cry1Ac, y no del todo a Cry1Ca, Cry2Aa, Cry2Ba y Cry3Aa (Valaitis *et al.*, 2001). El segundo receptor, llamado P252 ha sido aislado de las VMMA de *Bombyx mori* (Hossain *et al.*, 2004). El receptor purificado une a Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac bajo condiciones no desnaturalizantes.

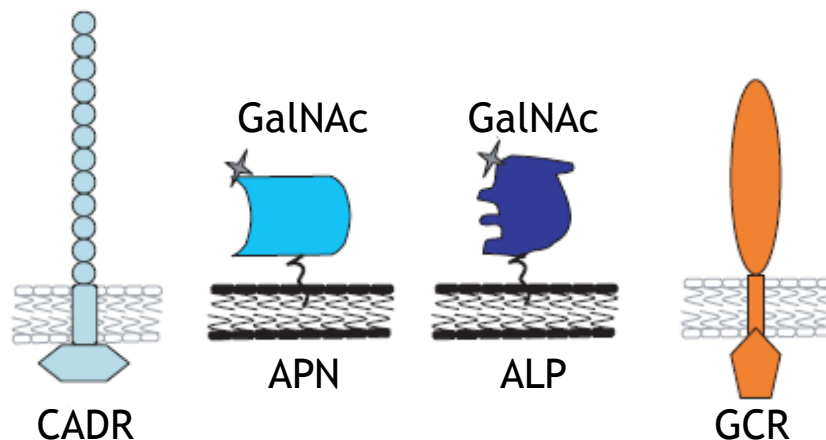


Figura 4. Moléculas receptoras para proteínas Cry1A. CADR (receptor caderina); APN (aminopeptidasa-N); ALP (alcalino fosfatasa); GCR (receptor glicoconjugado) (Bravo *et al.*, 2006).

2.2.4 Mecanismos de toxicidad de las toxinas Cry

Actualmente, nuestro grupo de investigación ha propuesto un mecanismo de acción de las toxinas Cry contra lepidópteros (Fig. 6); la toxina modelo utilizada fue la Cry1A. El modelo involucra la participación secuencial de dos receptores, caderina y aminopeptidasa (Gómez *et al.*, 2002; Bravo *et al.*, 2004).

A continuación se describen los pasos del mecanismo de toxicidad propuesto:

1. **Solubilización.**- Después de que larva ingiere la inclusión cristalina, ésta se solubiliza en el intestino debido a las condiciones alcalinas y reductoras del medio. Esto provoca que las proteínas Cry se liberen de los cristales como protoxinas de 130 kDa.
2. **Proteólisis.**- La protoxina es procesada por serinproteasas en el extremo N-terminal donde se cortan de 20 a 50 aminoácidos: 25-30 aminoácidos para las toxinas Cry1, 58 residuos para la Cry3A y 49 para la Cry2Aa (en la figura 5 se muestra una representación de la estructura de la protoxina Cry y sus sitios de corte por proteasas) (Soberón *et al.*, 2007). En el extremo C-terminal (cuando está presente) se cortan hasta 600 aminoácidos, dando lugar a un fragmento resistente a proteólisis de aproximadamente 60 kDa, al que se le llama toxina activa.

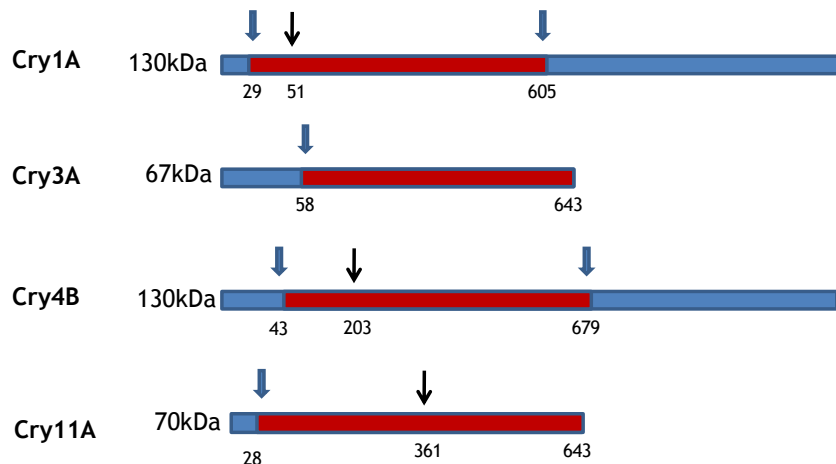


Figura 5. Longitud relativa de las protoxinas Cry y posición de la digestión de las proteasas. Los recuadros azules representan la protoxina y los recuadros rojos representan la toxina activada. Las flechas azules muestran los sitios de corte del amino y carboxilo terminal. Las flechas negras muestran los cortes intramoleculares. El corte de Cry1A en el residuo 51 resulta en una pérdida de la hélice α -1 y formación del pre-poro. El corte en Cry4Ba resulta en 2 fragmentos de 18 y 46 kDa, mientras que Cry11A resulta en dos fragmentos de 34 y 32 kDa (Bravo *et al.*, 2006).

- 3. Interacción con el primer receptor.-** La toxina, en su forma activa, interactúa con la proteína caderina; dicha interacción favorece un cambio conformacional en la toxina que provoca el corte de la hélice α -1. Esto conduce a la formación de oligómero en la toxina (por la exposición de regiones hidrofóbicas), produciendo así la estructura preporo.
- 4. Oligomerización.-** Se ha propuesto que la estructura oligomérica está conformada por tres o cuatro subunidades y se le ha considerado la entidad funcional para la formación del poro lítico.
- 5. Interacción con el segundo receptor.-** Con la formación de la estructura oligomérica, la toxina incrementa su afinidad por un segundo receptor, el cual se ha catalogado como una proteína anclada por GPI, la cual puede ser: una aminopeptidasa (APN) o una fosfatasa alcalina (APL).
- 6. Inserción y formación de poro en la membrana.-** En este último paso, el oligómero se conduce a la membrana en donde se inserta y forma un poro lítico que provoca un desbalance iónico que lleva a la lisis osmótica celular, parálisis intestinal y la muerte de la larva.

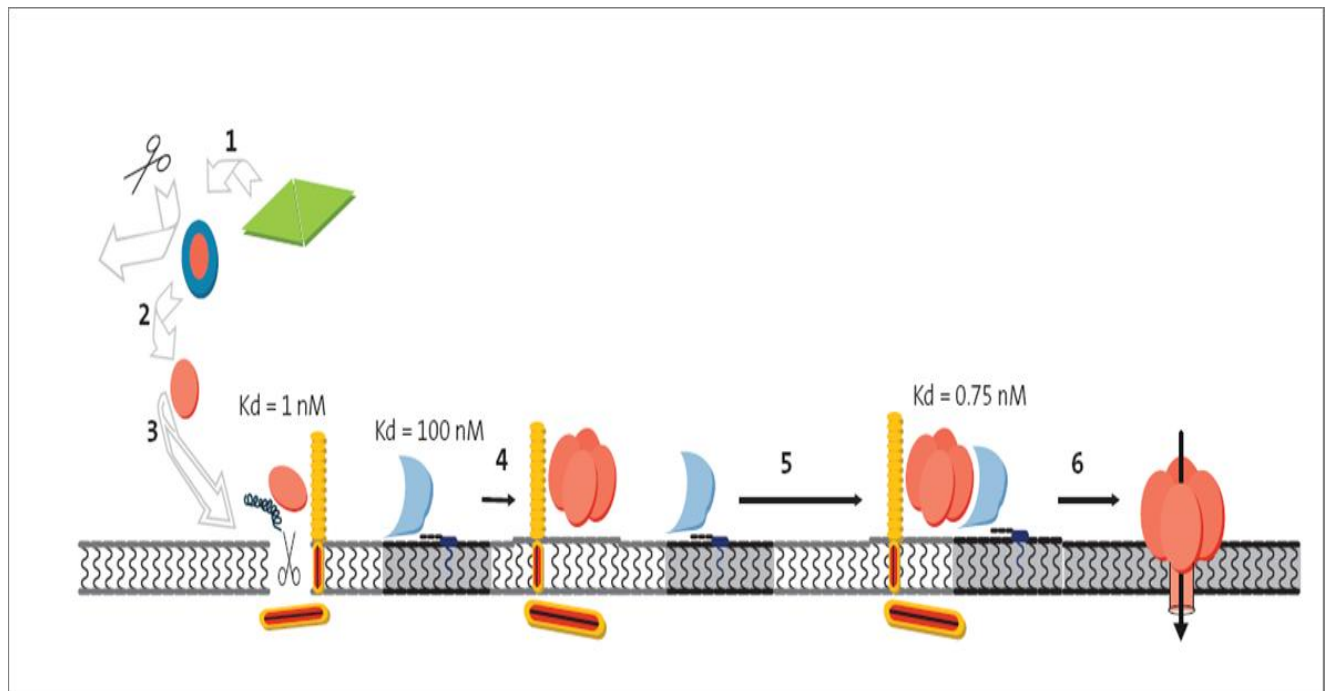


Figura 6. Mecanismo de acción propuesto de las toxinas Cry en lepidópteros. 1. Solubilización, 2. Procesamiento, 3. Unión al receptor caderina, 4. Formación del pre-poro, 5. Unión a la proteína anclada por GPI, 6. Inserción a la membrana. (Bravo *et al.*, 2004).

Como fue mencionado previamente, las toxinas Cry11Aa, Cry4A y Cry4B comparten estructuras similares con la toxina activa contra lepidópteros Cry1Aa, sugiriendo un mecanismo de acción de estas proteínas Cry en mosquitos.

En insectos lepidópteros, los cristales ingeridos por la larva susceptible son disueltos en el medio alcalino del intestino y liberados posteriormente como proteínas solubles. En el caso de la protoxina Cry11Aa de 70 kDa, la activación proteolítica usando extractos de intestino remueve 28 residuos del N-terminal y corta intramolecularmente resultando así dos fragmentos, de 34 y 32kDa (Dai y Gill, 1993), pero estos dos fragmentos permanecen asociados y retienen la toxicidad (Yamagiwa *et al.*, 2004). Éste es el mismo caso para la protoxina Cry4Ba de 130 kDa donde el N-terminal, el C-terminal y cortes intramoleculares resultan en una toxina activa comprendida por dos fragmentos, 18 y 46kDa (Angsuthanasombat *et al.*, 1993; Komano *et al.*, 1998). Como fue mencionado previamente, las toxinas Cyt también son sintetizadas como protoxinas; pequeñas porciones de su N- terminal y C-terminal, también son removidas para dar lugar a la toxina activa (Armstrong *et al.*, 1985, Gill *et al.*, 1987; Li *et al.*, 1996). En el caso de Cyt2Aa, 32 aminoácidos y 15 aminoácidos de los extremos del N-terminal y del C-terminal, respectivamente, son removidos mediante tratamiento con proteinasa K produciendo así, una proteína monomérica con actividad hemolítica (Koni y Ellar, 1994).

2.2.5 δ - endotoxinas Cyt

Las toxinas Cyt son un subconjunto de toxinas de *B. thuringiensis*. Se les denomina así, porque presentan actividad citolítica *in vitro*; aunque muestran especificidad contra dípteros *in vivo* (Soberón *et al.*, 2007). La estructura de un miembro de este grupo, Cyt2Ba, ha sido resuelta y revela un dominio sencillo y tres láminas α - β con un pliegue único, tal como se muestra en la figura 7.

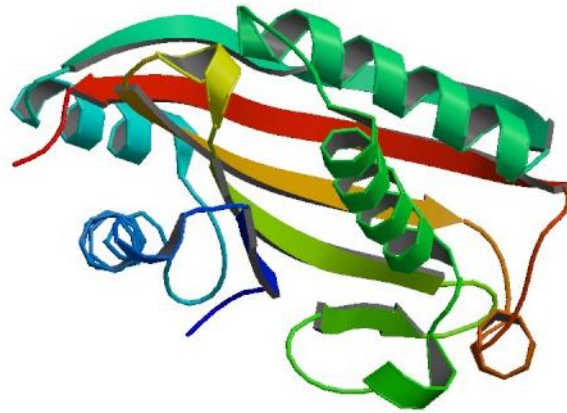


Figura 7. Estructura tridimensional de la proteína cristal citotóxica Cyt2Ba (PDB, 2RCI).

El mecanismo de acción plantea la solubilización del cristal en el ambiente alcalino del insecto liberando una protoxina dimérica (Cheong y Gill, 2003), unida por las láminas β del amino terminal; el procesamiento proteolítico rompe el entrelazamiento de dichas láminas β , para liberar a la toxina Cyt como un monómero activo (Li *et al.*, 1996). A diferencia de las toxinas Cry, las toxinas Cyt no se unen a las proteínas localizadas en el intestino del insecto, en su lugar éstas se unen de forma monomérica a los fosfolípidos insaturados de la membrana, preincubación de las toxinas Cyt con fosfolípidos neutraliza su actividad citolítica e insecticida (Li *et al.*, 1996). Por otro lado, aún se desconoce si esta toxina forma poros para lisar la célula, o si ejerce una acción tipo detergente sobre la membrana celular (Soberón *et al.*, 2007).

2.3 *Aedes aegypti*, el mosquito causante del dengue y la fiebre de chinkungunya

El mosquito conocido como *Aedes aegypti* es el causante de transmitir varias enfermedades como el dengue, la fiebre amarilla y la de chinkungunya. Se sugiere que el origen de *Aedes aegypti* es en el continente africano. A la fecha, se conocen tres variedades principales: *Aedes aegypti* var. *aegypti*, *Aedes aegypti* var. *formosus* y *Aedes aegypti* var. *queenslandensis*. De estas tres, *Aedes aegypti* var. *aegypti* es la más distribuida en el mundo (<http://www.who.int/topics/dengue/es/index.html>).

El *Ae. aegypti*, como todos los mosquitos, tiene dos fases bien diferenciadas en su ciclo de vida: fase acuática con tres formas evolutivas diferentes: (huevo, larva y pupa) y fase aérea o de adulto (Fig. 8).



Figura 8. Ciclo de vida de *Aedes aegypti*. Se presenta una fase acuática (huevo, larva y pupa) y una fase terrestre (adulto).

2.3.1 Dengue

Los virus del dengue se transmiten al ser humano por la picadura de la hembra de mosquitos *Aedes* infectivos (Gubler, 1998). *Aedes aegypti*, el principal vector, es un mosquito tropical, pequeño y de color blanco con negro (Fig. 9).

Los mosquitos suelen adquirir el virus mientras se alimentan de la sangre de una persona infectada (Putnam *et al.*, 1995 a y b; Platt *et al.*, 1997).

Tras la incubación del virus durante 8 a 10 días, un mosquito infectado es capaz de transmitir el virus para el resto de su vida, durante la picadura y la alimentación. Los mosquitos hembra infectados también pueden transmitir el virus a su descendencia por vía transovárica (a través de los huevos), pero todavía no se ha definido el papel de este mecanismo en la transmisión del virus al ser humano.

Los seres humanos infectados son los principales portadores y transmisores del virus, sirviendo como fuente de virus para los mosquitos no infectados. El virus circula en la sangre de los seres humanos durante 2 a 7 días, coincidiendo aproximadamente con el período febril, los mosquitos *Aedes* pueden adquirir el virus cuando se alimentan de una persona durante este período (Gubler *et al.*, 1998). Algunos estudios han revelado que los monos de ciertas zonas del mundo desempeñan una función similar en la transmisión.

Esta enfermedad puede ser con hemorragias (dengue hemorrágico) o sin hemorragias (dengue no hemorrágico), siendo el primero más peligroso.



Figura 9. Mosquito *Aedes aegypti* en su fase adulta. Transmisor del dengue y la fiebre de chikungunya.

(http://tropisme.files.wordpress.com/2009/10/aedes_aegypti_during_blood_meal.jpg)

La incidencia de dengue ha aumentado extraordinariamente en todo el mundo en los últimos decenios. Unos 2.5 mil millones de personas (dos quintos de la población mundial) corren el riesgo de contraer la enfermedad. La OMS calcula que puede haber 50 millones de casos de dengue en todo el mundo. Sólo en el 2007 se notificaron 890 000 casos en América, de los cuales 26 000 fueron dengue hemorrágico.

La enfermedad es endémica en más de 100 países de África, América, el Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental. Las dos últimas son las regiones más afectadas.

La propagación del dengue se atribuye a la expansión de la distribución geográfica de los cuatro virus del dengue y sus mosquitos vectores, el más importante de los cuales es *Aedes aegypti*, una especie predominantemente urbana (<http://www.who.int/topics/dengue/es/index.html>).

2.3.2 Fiebre de chikungunya

La fiebre chikungunya es una enfermedad vírica que se propaga por la picadura de mosquitos infectados. Su mecanismo de transmisión es igual que para el virus del dengue (hombre infectado-hembra de *Aedes aegypti* - hombre). La enfermedad generalmente dura entre cinco y siete días, y produce de manera frecuente dolores articulares graves, a menudo incapacitantes, que a veces

persisten mucho más tiempo. Raramente pone en peligro la vida del paciente. La enfermedad carece de tratamiento específico, pero se pueden utilizar analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos para reducir el dolor y la tumefacción. No hay vacuna contra el virus (<http://www.who.int/features/qa/63/es/index.html>).

La fiebre de chinkungunya se transmite principalmente en: África, India y el sureste Asiático; también ha habido un número de brotes en Filipinas.

2.3.3 Prevención y control

Desafortunadamente, las herramientas disponibles para prevenir la infección del dengue y de chinkungunya son muy limitadas. Actualmente, no existe ninguna vacuna disponible y las opciones para el control de mosquitos son limitadas. Claramente, el énfasis debe de darse en la prevención de la enfermedad y no una vez que ésta ha sido adquirida.

Algunas de las medidas que se han tomado para controlar la transmisión de estas enfermedades son:

→El uso de insecticidas

Diversos insecticidas se han desarrollado para atacar algunas plagas de insectos, muchos de ellos han sido comercializados en los últimos años:

- **Clorfenapir** (4-Bromo-2-(4-clorofenil)-1-etoximetil-5-trifluorometil-1H-pirrol-3-carbonitrilo): Actúa disrumpiendo la producción de trifosfato de adenosina; específicamente, mediante la eliminación oxidativa del grupo N-etoximetil del cloranfenapir con la ayuda de diferentes oxidasas; generando así, un compuesto (CL 303268) capaz de desacoplar la fosforilación oxidativa del gradiente de protones. Resultando en la disrupción de la producción de ATP y en la muerte celular (Black *et al.*, 1994).
- **Diafentiouron** (3-(2,6-diisopropil-4-fenoxifenil)-1-ter-butil-tiourea): También actúa inhibiendo la ATPasa mitocondrial mediante la reacción covalente de la carbodiimida (producto del diafentiouron) con dos proteínas mitocondriales: F0 y una porina (Ruder *et al.*, 1991).
- **Hidrametilnon**, es un compuesto químico orgánico conocido también como AC 217.300. Pertenece a la clase química llamada: trifluorometil aminohidrazona, y su mecanismo de acción es inhibir la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Hollingshaus *et al.*, 1984).

- **Imidacloprid** (*N*-[1-[(6-cloro-3-piridil) metil]-4,5-dihidroimidazol-2-il] nitramida): Interacciona con el receptor acetilcolina nicotínico (Elbert *et al.*, 1990; Bai *et al.*, 1991).

Si bien es cierto que estos insecticidas han ayudado de alguna manera a disminuir las plagas de insectos vectores de enfermedades, también es importante mencionar los inconvenientes que presentan: alto costo de producción de los mismos; baja rentabilidad (por ejemplo, los países con mayor necesidad de controlar a estos vectores no tienen los recursos suficientes para comprar estos productos); no son específicos para matar a un solo insecto y finalmente, no son biodegradables.

→El uso de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

Las toxinas Cry de *Bti* llegan a ser una alternativa para el control de mosquitos vectores de enfermedades. De los cristales producidos por *Bti* (Cry4Ba, Cry4Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa y Cyt2Ba) Cry11Aa y Cry4Ba son las más tóxicas contra la larva de mosquito de *Aedes aegypti* (Schnepf *et al.*, 1998).

Las ventajas de estas toxinas es que llegan a ser muy específicas contra sus insectos blanco (cuando se aplican no matan a la población de otros insectos), son biodegradables, inocuas para el ser humano y de muy fácil producción.

Es por ello que en este trabajo nos hemos enfocado en la utilización de la toxina Cry4Ba como la alternativa más viable para combatir a la larva de *Aedes aegypti*.

3. ANTECEDENTES PARTICULARES

3.1 Toxinas Cry

3.1.1 Mutaciones en el asa 1 y 2 del dominio II de la toxina Cry4Ba, redujeron la actividad contra *Aedes aegypti*.

Se ha observado que en las toxinas Cry, las regiones expuestas del dominio II desempeñan un papel crucial en la especificidad de la toxina, ya que son las que interaccionan con el receptor (Soberón *et al*, 2007). Para ver el efecto que tienen las regiones expuestas del dominio II de la toxina Cry4Ba contra *Aedes aegypti*, se realizó un alineamiento de las secuencias de la Cry4Aa con la Cry4Ba y con base a ello, se generaron mutantes de Cry4Ba en las asas 1, 2 y 3 de tal forma que imitaran, en aminoácidos y en longitud, a las asas 1,2 y 3 de Cry4Aa mediante mutagénesis dirigida al sitio. Posteriormente, se analizó el efecto de estas mutantes en un bioensayo de insectos observándose que la mutante en el asa 3 de Cry4Ba causó un incremento significativo en la toxicidad contra *C. quinquefasciatus* (>700 veces) y *C. pipiens* (>285 veces), sin alterar su efecto contra *Aedes* y *Anopheles*. No obstante, cuando se probaron las mutantes en el asa 1 y 2 se reportó una disminución en la actividad contra *A. aegypti* y *A. quadrimaculatus*; indicando así, el papel fundamental de estas dos asas en el mecanismo de acción contra *Aedes aegypti* (Abdullah *et al.*,2003).

3.1.2 Mutaciones en las regiones de las asas del dominio II de la toxina Cry19Aa incrementaron su actividad contra *Aedes aegypti*.

De manera natural, la toxina Cry19Aa es tóxica contra *Anopheles stephensi* y *Culex pipiens*, pero no presenta actividad considerable contra *Aedes aegypti*. Por ello, siguiendo el esquema anterior, Abdullah y col. probaron si la toxicidad contra *Aedes aegypti* podía ser transferida a la toxina Cry19Aa mediante el intercambio de las regiones de las asas del dominio II con la finalidad de imitar a Cry4Ba. El asa 1 de Cry19Aa 355SYWT358 se mutó a YQDLR, mientras que el asa 2 (414YPWGD418) fue deletado (la mutante se le llamó 19AL1L2). Posteriormente, se hicieron bioensayos para probar la toxicidad de Cry19Aa y sus mutantes en: *Anopheles quadrimaculatus*, *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex pipiens*. Como resultado obtuvieron que la mutación en Cry19Aa incrementó la actividad contra *A. aegypti* 42, 000

veces. Este aumento en la toxicidad no tuvo efecto alguno contra las especies de *Anopheles* y *Culex* (Abdullah *et al.*, 2004).

3.1.3 Mutagénesis dirigida de la toxina Cry4Ba en los residuos de las asas del dominio II afecta la actividad larvica.

Analizando la estructura de la toxina Cry4Ba, se ha visto que posee seis asas expuestas en el dominio II comprendidas entre las regiones: B1- α 8, B2- B3, B4- B5, B6- B7, B8- B9 y B10- B11. En este estudio, se cambiaron algunos residuos de las asas que comprenden las regiones: B6- B7 (S₃₈₇SPS₃₉₀), B8- B9 (S₄₁₀, N₄₁₁, T₄₁₃, T₄₁₅, E₄₁₇ y G₄₁₈) y B10- B₁₁ (D₄₅₄YNS₄₅₇) por residuos de alanina. Posteriormente, todas las toxinas mutantes fueron expresadas en *E. coli* JM109 como protoxinas de 130kDa y después fueron probadas en bioensayos contra *Aedes aegypti*. Solamente las mutantes P389A, S410A, E417A, Y455A y N456A exhibieron una pérdida de toxicidad del 30% comparada con la toxina silvestre. Además, las dobles mutantes (S410A/E417A ó Y455A/N456A) revelaron una pérdida de toxicidad de aproximadamente el 70%. Estos experimentos sugieren que S₄₁₀ y E₄₁₇ en el asa de B8-B9, y Y₄₅₅ y N₄₅₆ en el asa de B10- B11 están involucradas en la actividad larvica de la toxina Cry4Ba (Tutitippawan *et al.*, 2007).

3.1.4 La toxina Cry1Aa fue rediseñada para ser capaz de tener especificidad contra mosquitos.

La toxina Cry1Aa, de manera natural, tiene como blanco a *Manduca sexta* y a otros insectos como: *Plutella xylostella*, *Ostrinia nubilalis*, *Maruca vitrata*, entre otros lepidópteros. Teniendo como antecedente de que a algunas toxinas Cry se les ha incrementado su actividad mediante mutagénesis dirigida al sitio, en el 2006 Liu y Dean, publicaron un trabajo donde a dicha toxina le confierieron toxicidad contra dípteros.

Las primeras dos regiones del asa de Cry1Aa fueron cambiadas (Abdullah *et al.*, 2003). Los residuos del asa 1 de Cry1Aa (³¹¹RG³¹²) fueron reemplazados por YQDL. Esta mutante fue llamada L1. El asa 2 de Cry1Aa, ³⁶⁷RRILGSGPNNQ³⁷⁸ fue alterada en dos pasos por separado. Primero se deletó LYRRIL para producir una mutante intermedia llamada D3. La mutación del asa 1 en L1 fue después introducida a D3 para crear una mutante de referencia llamada L1D3. Finalmente, se hizo una sustitución adicional de

NNQ por G para imitar a la Cry4Ba. Con esto, obtuvieron una toxina Cry1Aa mutante con una actividad mayor contra *Culex pipiens* comparada con otras toxinas como: Cry1Ca, Cry2Aa, Cry4Ba y Cry20Aa (Liu *et al.*, 2006).

3.2 Sinergismo entre las toxinas Cry y Cyt de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*

En un trabajo reciente se demostró que la proteína Cyt1Aa sinergiza la toxicidad de Cry11Aa funcionando como una molécula receptora. La unión de Cry11Aa a las VMMA de *A. aegypti* se vio incrementada por la unión de Cyt1Aa a la membrana y por la posterior interacción de ambas toxinas. De la misma forma, se identificaron los epítomos de Cyt1Aa que unen a Cry11Aa (asa B6- α E y parte de la B7) (Pérez *et al.*, 2005). Posteriormente, para complementar dicho estudio, se identificaron las regiones del dominio II de la toxina Cry11Aa (asa α -8, B-4 y asa 2) que están involucradas en la unión con Cyt1Aa (Fernández *et al.*, 2006). La mutagénesis de residuos aminoacídicos específicos demostró que la unión de estas dos toxinas correlaciona con el sinergismo (Pérez *et al.*, 2005).

Esta interacción de Cry11Aa es similar a la que tiene con su receptor natural. Por consiguiente, éste es el primer ejemplo de una bacteria patógena de insectos que no solamente produce una toxina si no también su receptor funcional. En la figura 10 se muestra cómo la Cry11Aa se une a la toxina Cyt1Aa, la cual cumple su papel como su proteína receptora.

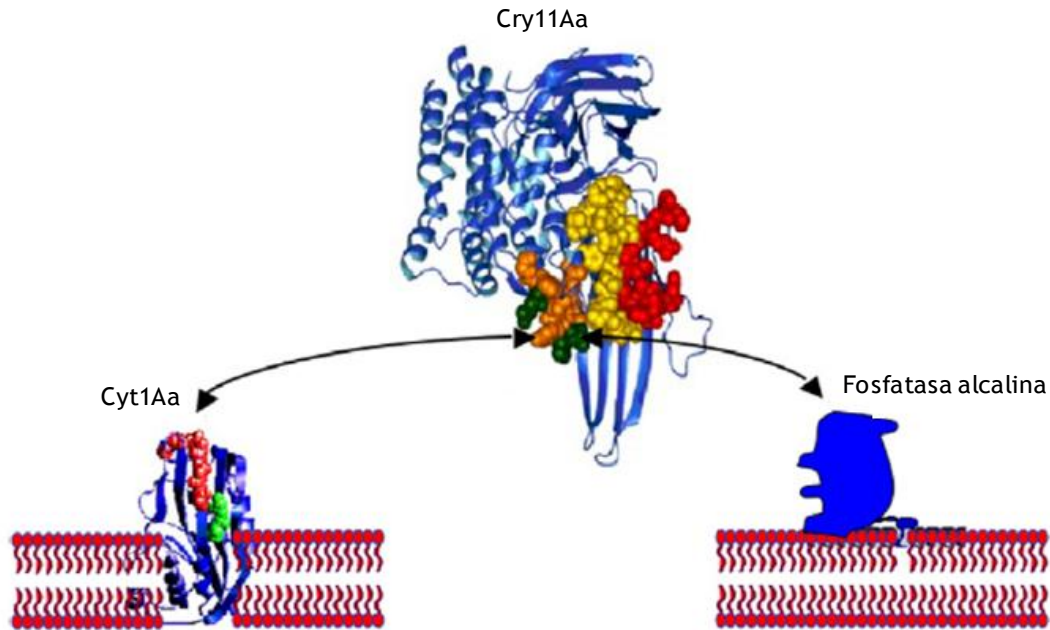


Figura 10. Sinergismo de las toxinas Cyt1Aa-Cry11Aa. La toxina Cyt1Aa actúa como proteína receptora de la toxina Cry11Aa, incrementando así su efecto tóxico contra las larvas de mosquito (Pérez *et al.*, 2005).

3.3 Receptor fosfatasa alcalina

3.3.1 La fosfatasa alcalina de *Aedes aegypti* es una proteína de unión importante para la toxina Cry4Ba

En el 2002 Buzdín *et al.*, identificaron dos proteínas del intestino de larvas de *Aedes aegypti*, una de 65kDa y otra de 62kDa, que unían a las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa. Posteriormente, en un trabajo más reciente (Bayyareddy *et al.*, 2009) se identificaron, mediante estudios de proteómica, tres isoformas de fosfatasa alcalina en el intestino de *Aedes aegypti* que unen a la Cry4Ba. Cada isoforma de ALP detectada en la preparación de VMMA cuenta con un péptido señal predicho y una secuencia de unión al ancla de GPI cerca del C-terminal de la proteína.

3.3.2 El asa α -8 y el asa 3 del dominio II de Cry11Aa, son regiones involucradas en la unión al receptor en *Aedes aegypti*.

En trabajo previo en el laboratorio se identificaron las regiones de la toxina Cry11Aa que interaccionan con su receptor en *Aedes aegypti* mediante un alineamiento de la estructura entre Cry2Aa con Cry11Aa. De las regiones expuestas, se construyeron péptidos sintéticos y se usaron para competir la unión de la toxina Cry11Aa a las vesículas de la microvellosidad apical (VMVA) de *A. aegypti*; como resultado se obtuvo que el asa α -8, el asa 3 y la región B4 compitieron la unión de Cry11Aa, concluyéndose así, que estaban involucrados en la unión al receptor. El papel del asa α -8 de Cry11Aa en la interacción con el receptor fue determinado empleando las técnicas de despliegue en fagos y mutagénesis sitio dirigida. Como resultado se obtuvo un fago-péptido (P5.tox) que interactúa con la Cry11Aa y afecta la unión de la toxina a las VMVA. La presencia de este fago-péptido provocó una disminución del 50% en la toxicidad de Cry11Aa en bioensayos realizados con larvas de *A. aegypti*, confirmando la importancia de esta región en la unión al receptor (Fernández *et al.*, 2005).

3.3.3 La Fosfatasa Alcalina anclada a la membrana del intestino de *Aedes aegypti* por GPI (glicosilfosfatidilinositol), es un receptor que interactúa con la toxina Cry11Aa.

Las fosfatasas alcalinas son metaloenzimas que contienen zinc y magnesio, las cuales hidrolizan ésteres de fosfato a pH básico.

Por experimentos anteriores en el laboratorio, se caracterizó a una fosfatasa alcalina (proteína de 65 KDa anclada por GPI a la membrana) como un receptor de la toxina Cry 11Aa en *Ae. aegypti*. Buscando un receptor unido por GPI, se realizaron experimentos de unión a ligando de la toxina con las VMVA antes y después de tratarlas con PIPLC (remueve las proteínas ancladas por GPI). Los resultados revelaron que la toxina Cry11Aa se une a dos proteínas ancladas por GPI, una de 100 KDa y otra de 65 KDa. Posteriormente el sobrenadante obtenido después de tratar a las VMVA con PIPLC, fue pasado por una columna donde previamente se acopló a la toxina Cry11Aa en su forma nativa, se observó que de esta manera sólo se une la proteína de 65KDa, la cual se identificó como Fosfatasa Alcalina al medir su actividad enzimática.

Se identificó un fago péptido (P1.BBMV) que une a la fosfatasa alcalina, afectando tanto la unión de Cry11Aa a las VMVA, como su toxicidad. Se compitió la unión de este fago péptido con los péptidos sintéticos de las regiones del asa α -8, β -4 y el asa 3, se observó que solo el asa α -8 inhibía la unión de P1.BBMV a las VMVA, lo que sugiere que unen en el mismo sitio y corrobora la importancia del asa α -8 de la toxina Cry 11Aa para la unión al receptor (Fernández *et al.*, 2006).

Se identificaron tres DNAs complementarios que codifican para tres isoformas de fosfatasa alcalina de RNA's de intestino de *Ae. aegypti*. Las proteínas ALP se expresaron en *E. coli* y se mostró que una de ellas (ALP1), une a la toxina Cry11Aa, la Cry4Ba y al fago-péptido P1.BBMV, identificándola como el receptor de estas toxinas Cry (Fernández *et al.*, 2009).

3.4 Receptor caderina

3.4.1 La caderina AgCad1 de *Anopheles gambiae* une a la toxina Cry4Ba de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

Se ha sugerido que las toxinas Cry activas contra insectos dípteros, utilizan la misma clase de proteínas receptoras que las toxinas Cry1 contra lepidópteros. En un trabajo del 2008 de Hua *et al.*, se realizó la clonación e identificación de una proteína tipo caderina del intestino de *Anopheles gambiae* (AgCad1). Mediante la técnica de inmunquímica, se determinó que esta caderina estaba localizada en la región posterior del intestino de la larva y además, se observó su papel como receptor de Cry4Ba cuando se analizó la unión de esta toxina a la misma región donde se encontraba la caderina. Posteriormente, cuando se prepararon VMMA de *Anopheles gambiae* para ser utilizadas en ensayos de unión a ligando, se vio que la Cry4Ba se unía a una proteína del mismo tamaño que la caderina, 200kDa. El papel de la caderina como receptor putativo fue complementado mediante el sinergismo mostrado entre Cry4Ba y el péptido CR11MPED, el cual posee la región proximal de AgCad1 a la célula.

3.4.2 La caderina de *Aedes aegypti* sirve como receptor putativo de la toxina Cry11Aa de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

Para determinar si la caderina también poseía un papel clave como receptor putativo de la toxina Cry11Aa en *Aedes aegypti*, primero se aisló el cDNA de la caderina de la larva de *Aedes* y

posteriormente se expresaron en *E. coli* fragmentos sobrelapantes que cubrían a la proteína completa. Los fragmentos expresados fueron G7 (posee los residuos de caderina 121-726, contiene CR1-4 y parte de CR5), C13 (posee los residuos de caderina 440-952, contiene parte del CR3 y CR4-7) y G10 (posee los residuos de caderina 911-1696, contiene parte de CR7 y CR8-11).

Posteriormente, mediante ensayos de unión a ligando, se observó que el fragmento de caderina G10 unía a las asas α -8 y 2 de la toxina Cry11Aa. Este resultado indicó que la caderina de *Aedes* es un posible receptor para la toxina Cry11Aa y además, en conjunto con la fosfatasa alcalina, se pudiera sugerir un mecanismo de acción de dípteros similar al propuesto para lepidópteros (Chen *et al.*, 2009).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hemos visto que las toxinas Cry son proteínas que llegan a ser muy específicas contra ciertos órdenes de insecto. Esta característica les permite ser una alternativa viable para combatir diversos problemas de plagas, que a la larga, pudiesen tener consecuencias económicas (pérdida de cultivos) o de salud pública (dengue y malaria).

En el modelo del mecanismo de acción de insectos lepidópteros planteado por Bravo *et al.*, en el 2004, se propone que la toxina Cry1A sufre un cambio conformacional después de interactuar con un primer receptor (caderina) y esto le permite unirse a una segunda proteína receptora anclada por GPI, la cual puede ser: una aminopeptidasa-N o una fosfatasa alcalina. Por la literatura revisada en dípteros, se han identificado algunas proteínas en las VMMA's que pudiesen actuar como receptores de las toxinas Cry específicas para estos insectos, tales como caderina (Hua *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009) la fosfatasa alcalina (Buzdin *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2009; Bayyareddy *et al.*, 2009).

La idea fundamental de este trabajo es conocer cuáles son las regiones de las asas expuestas del dominio II de la toxina Cry4Ba, producida por *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, que pudiesen ser epítomos importantes en la interacción con sus proteínas receptoras y, al mismo tiempo, analizar su unión con Cyt1Aa, la cual se ha reportado que ejerce un efecto sinérgico en Cry11Aa al actuar como su receptor (Pérez *et al.*, 2005)

En este proyecto, se ha planteado el aislamiento y caracterización de mutantes de las asas del dominio II de la toxina Cry4Ba en cuanto a su actividad tóxica y unión a receptores de *Aedes aegypti*.

5. HIPÓTESIS

Las asas expuestas del dominio II de la toxina Cry4Ba: asa α -8, asa1, asa2 y asa 3, están relacionadas con la interacción a fosfatasa alcalina, caderina y Cyt1Aa.

6. OBJETIVO GENERAL

Identificar las regiones del dominio II de la toxina Cry4Ba que interaccionan con: fosfatasa alcalina, caderina y Cyt1Aa.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar mutantes en las asas del dominio II de Cry4Ba con base al resultado obtenido del ensayo de competencia de los péptidos sintéticos por la unión Cry4Ba-ALP1.
- Caracterizar dichas mutantes mediante bioensayos a las larvas de *Aedes aegypti* y ensayos de unión a la ALP1, a los fragmentos de caderina y a Cyt1Aa.

8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

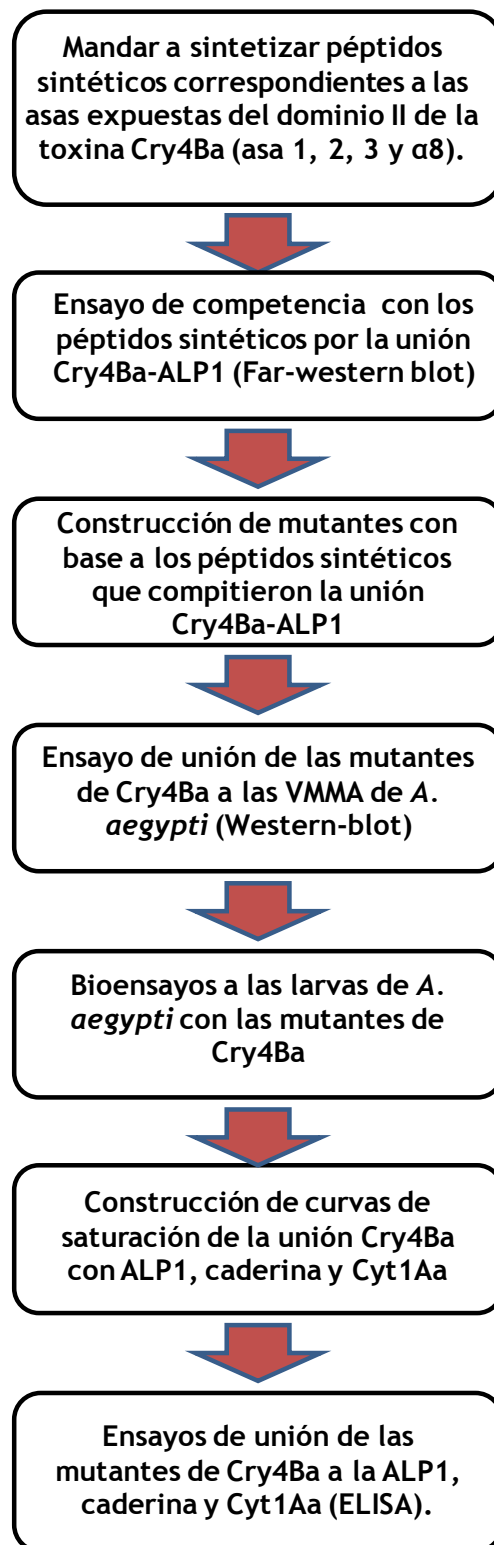


Figura 11. Diagrama descriptivo de la estrategia experimental.

8.1 Construcción de péptidos sintéticos.

Como se mencionó anteriormente, se mandaron a sintetizar péptidos correspondientes a las regiones expuestas del dominio II de la toxina Cry4Ba: asa 1, asa 2, asa 3 y asa $\alpha 8$.

8.2 Competencia de péptidos sintéticos por la unión de la toxina Cry4Ba a la ALP1.

Con los péptidos sintéticos se planteó realizar un ensayo de competencia por la unión de la toxina Cry4Ba con la fosfatasa alcalina recombinante ALP1. El experimento se llevó a cabo mediante la prueba de unión a ligando. La idea fue preincubar distintos excesos de los péptidos sintéticos con la ALP1 y después de esto, incubar con la toxina Cry4Ba. Para revelar la unión de Cry4Ba a la ALP1 se utilizó un anticuerpo anti-histidinas.

8.3 Construcción de mutantes.

El experimento anterior fue una pieza clave para el diseño de las mutantes de la toxina Cry4Ba. Es decir, se decidió mutagenizar las asas de la toxina que correspondieron a los péptidos que llegaron a competir la unión Cry4Ba-ALP1. Se realizó mediante el reemplazamiento de algunos aminoácidos por residuos de alanina (“scanning” de alanina). Se seleccionó a la alanina por ser uno de los α - aminoácidos más simples con respecto a la estructura molecular y por no presentar carga eléctrica. Cabe mencionar que la glicina también es un aminoácido neutro y además, es el más pequeño; sin embargo, no se consideró para los reemplazamientos porque su flexibilidad podría haber afectado a los aminoácidos vecinos.

8.4 Bioensayos a larvas de *Aedes aegypti*.

Con la idea de ver cómo es que las mutantes construidas están afectadas en toxicidad, se realizaron bioensayos con larvas de *Aedes aegypti*. Se empleó como parámetro de referencia la dosis letal 50 (LD50), es decir la concentración requerida en ng/mL para que el 50% de la población de larvas muera. Para ésto, se realizaron ensayos para obtener un rango de concentraciones de toxina que provocara del 10%-90% de mortalidad de las larvas, posteriormente se calculó la LD50 usando el método de Probit mediante un programa estadístico (Soft TOX).

8.5 Ensayo de unión.

Las mutantes de Cry4Ba obtenidas, fueron sometidas a ensayos de unión tanto a la ALP, Cyt1Aa y a los fragmentos de caderina C13, G7 y G10, así como a las VMMA de larvas de *Aedes aegypti*. De esta manera se pudo observar si alguna de estas mutantes de Cry4Ba estaba afectada en unión a alguna(s) de estas moléculas receptoras.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Soluciones y medios de cultivo

A menos que se indique, todas las soluciones fueron aforadas con H₂O hasta obtener el volumen final indicado.

Amortiguador de corrida 10X (1L: 144 g de glicina, 30 g de tris base, 10 mL de SDS al 10%).

Amortiguador de transferencia 1X (1L: 3 g de tris base, 14.4 g de glicina y 200 mL de metanol absoluto).

Amortiguador de carbonatos 5X (100mL: 5.5 g de Na₂CO₃, 4.2 g de NaHCO₃, pH10.2).

LB (1L: 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, pH 7.0).

MET (10mL: 0.55 g de manitol, 0.02 g de EGTA, 0.02 g de tris base).

2xTY (1L: 16 g de bacto-triptona, 10 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, pH 7.0).

SB (1L: 35 g de bacto-triptona, 20 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, pH 7.5).

SOB (1L: 5 g de bacto-triptona, 1.25 g de extracto de levadura, 0.125 g de NaCl, 2.5 mL de KCl 0.25 M, pH 7.0).

SOC (10.2mL: 10mL de SOB, 0.1mL de glucosa 2M, 0.1 mL de MgCl₂ 1M).

SP (1L: 8 g de caldo nutritivo, 0.25 g de MgSO₄.7H₂O, 1g de KCl, stock 1, stock2, stock 3, pH 7.0).

stock 1.- 0.198 g MnCl₂.4H₂O en 100 mL de H₂O.

stock 2.- 3.66 g de FeSO₄.7H₂O en H₂SO₄ 1 N (2.8 mL de H₂SO₄ concentrado en 100 mL de H₂O).

stock 3.-7.35 g de CaCl₂.2.H₂O en 100 mL H₂O.

Todas las soluciones se filtran.

PBS 10X (1L: 14.4 g de Na₂HPO₄, 2.4 g KH₂PO₄, 80 g de NaCl, 2 g de KCl, pH 7.4).

TAE 50X (1L: 242 g de tris base, 57.1 mL de ácido acético glacial, 37.2 g de EDTA, pH 8.5).

TTN (1L: 2.42 g de tris base, 17.53 g de NaCl, 10.0 mL de tritón X-100, pH 7.2).

9.2 Cepas utilizadas

Cepas de *Bacillus thuringiensis*

- ✓ *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*/4Q2-81 pHT618 que contiene el gen de la proteína Cry4Ba con resistencia a eritromicina.
- ✓ *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*/CG6 que contiene el gen de la proteína Cry11Aa con resistencia a eritromicina.
- ✓ *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*/pWF45 que contiene el gen de la proteína Cyt1Aa con resistencia a eritromicina.
- ✓ *Bacillus thuringiensis* serovariedad 1 407 (acristalífera).

Cepas de *Escherichia coli*

- ✓ Cepa de expresión de *E. coli* ER2566 que posee el vector pET-32b que contiene clonada a la ALP1.
- ✓ Cepa de expresión de *E. coli* M15(pREP4) que posee el plásmido pQE32G7 que contiene clonada el fragmento parcial de caderina G7.
- ✓ Cepa de expresión de *E. coli* M15(pREP4) que posee el plásmido pQE32C13 que contiene clonada el fragmento parcial de caderina C13.
- ✓ Cepa de expresión de *E. coli* M15(pREP4) que posee el plásmido pQE30G10 que contiene clonada el fragmento parcial de caderina G10.
- ✓ Cepa electrocompetente de *E. coli* XL1blue.

9.3 Purificación de la protoxina Cry4Ba, Cry11Aa y Cyt1Aa

Se utilizaron las cepas correspondientes con los genes *cry4Ba*, *cry11Aa* y *cyt1Aa* para la producción de las toxinas Cry4Ba, Cry11Aa y Cyt1Aa, respectivamente. Posteriormente, las cepas se hicieron crecer en medio de esporulación (SP) con eritromicina (5 µg/mL para Cry4Ba; 10 µg/mL para Cry11Aa y Cyt1Aa) por 72 horas a 30°C con agitación, hasta completar la esporulación.

El cultivo se recuperó centrifugando a 10, 000 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante; la pastilla se resuspendió y lavó con una solución 0.3 M de NaCl, 0.01 M de EDTA (pH 8), centrifugando en las mismas condiciones anteriores tres veces.

Se hicieron tres lavados de la pastilla en agua con PMSF 1 mM. Finalmente, se resuspendió la pastilla en una solución amortiguadora TTN (20 mM de tris, 300 mM de NaCl, tritón X-100 0.01% pH 7.2) y se sonicó la muestra dando tres pulsos de 50 segundos, a 20 watts con 1 minuto de descanso en hielo entre cada sonicación.

Para la purificación de los cristales por gradiente de sacarosa, se utilizaron las siguientes concentraciones: 84, 79, 72 y 62% de sacarosa agregando a cada una de estas 2 mL de tris-HCl pH 8, 80 μ L de NaCl 5 M y 400 μ L tritón X-100 al 1%, se centrifugó a 23000 rpm por 20 min a 15°C.

Se separaron las fracciones obtenidas y se recuperó aquella que contenía los cristales. Para eliminar la sacarosa, se lavó la fracción con agua desionizada con tritón X-100 0.01%, centrifugando a 10, 000 rpm durante 10 min 3 veces. Finalmente, se resuspendió la pastilla en Tris-HCl 50 mM pH 8, 1 mM de PMSF y se almacenó a 4°C.

9.4 Solubilización y activación de las toxinas Cry4Ba, Cry11Aa y Cyt1Aa

→Para Cry4Ba

Una vez purificados los cristales, se solubilizaron durante dos horas a 4°C en una solución de carbonatos (Na_2CO_3 y NaHCO_3 1X, pH 10.2). Posteriormente se adicionó β -mercaptoetanol (concentración final 0.02%), se centrifugó a 10 000 rpm/10 minutos y se recuperó el sobrenadante, la proteína se cuantificó por el método de Bradford.

Para la activación, la protoxina se neutralizó con una solución de Tris-HCl 1M, pH 8. Después, se incubó con tripsina (en una proporción 1:20 p/p) por 4 horas a 37°C y con agitación. Pasado este tiempo, se adicionó PMSF (concentración final 1 mM); se centrifugó 10 minutos a 10 000 rpm y se recuperó el sobrenadante. La cantidad de toxina obtenida se cuantificó por el método de Bradford y su tamaño se determinó en SDS-PAGE al 12%.

→ Para Cry11Aa

Los cristales se solubilizaron durante 4 horas con 100mM de NaOH. Se centrifugaron a 10000 rpm y se recuperó el sobrenadante. La proteína fue cuantificada siguiendo el método de Bradford. Para la activación, la protoxina se neutralizó adicionando Tris-HCl pH 8, hasta que el pH de la solución se encontró entre 8 y 8.5. Se incubó con tripsina en una proporción 1:50 (p/p), dos horas a 25°C con agitación suave. La reacción se detuvo con 2.5 mM de PMSF; se centrifugó 10 minutos a 10000 rpm y se recuperó el sobrenadante. La cantidad de toxina obtenida se cuantificó por el método de Bradford y el tamaño se analizó en SDS-PAGE al 12%:

→ Para Cyt1Aa

La solubilización se llevó a cabo con la solución de carbonatos 1X, pH 10.5 en presencia de 0.01 M de DTT durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10 000rpm/4°C por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteína soluble mediante la cuantificación por Bradford. Para la activación se agregó proteinasa K (stock 1mg/mL) al sobrenadante en una proporción 1:30 (p/p) (proteasa/proteína) por 1 hora a 30°C. Finalmente, la reacción se detuvo con la adición de PMSF a una concentración final de 1 mM. La muestra se centrifugó a 10 000rpm a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó por el método de Bradford. Al igual que la Cry11Aa y la Cry4Ba, la proteína se verificó mediante SDS-PAGE al 15%.

9.5 Expresión y purificación de la fosfatasa alcalina recombinante (ALP1).

La cepa de expresión de *E. coli* ER2566 se transformó con el vector (pET-32b) con inserto como se describe:

1. Se añadió 1µL del plásmido que contiene el gene que codifica para la ALP1 a una alícuota de 75 µL de células y se incubaron en hielo por 30 minutos.
2. Las células se sometieron a un choque térmico (42°C/2minutos) e inmediatamente se incubaron en hielo por 2 minutos.
3. Pasado este tiempo, se adicionaron 500 µL de LB y se recuperaron las células por 1 hora a 37°C.
4. Se platearon 20 µL de las células recuperadas en cajas de petri con LB-ampicilina (100 µg/mL).

5. Las cajas fueron incubadas por 12 horas a 37°C.
6. Se preparó un inóculo de las clonas a expresar en 3 mL de medio 2xTY con 100 µg/mL de ampicilina y 2% de glucosa. Se incubó por 12 horas a 30°C a 250 rpm.
7. Posteriormente, se inoculó con 1 mL de precultivo en un matraz con 50 mL de medio 2xTy con 100 µg/mL de ampicilina. Se dejó incubando hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.6 a 600 nm.
8. Una vez alcanzada la densidad óptica, la expresión de la fosfatasa alcalina en la cepa ER2566 fue inducida con 1mM de IPTG por 5 horas a 30°C a 250 rpm. (La expresión de la fosfatasa alcalina en cada hora fue analizada en SDS-PAGE al 12%).
9. Las células se recuperaron centrifugando el cultivo a 14,000 rpm durante 10 minutos. La pastilla se resuspendió en 5 mL de una solución (100 mM de NaH₂PO₄, 10 mM de Tris-HCl y 8 M de urea, pH 8) por gramo de células.
10. La muestra fue sonicada dando dos pulsos de 10 watts por 1 minuto. Después se centrifugó por 20 minutos a 14, 000 rpm y se recuperó el sobrenadante.
11. Para la purificación, se empaquetó una columna cromatográfica con 1 mL de resina Níquel-agarosa (QIAGEN) y se equilibró con PBS 1X (de 5 a 10 mL).
12. La columna fue lavada con 10 mL de imidazol 20 mM y posterior a esto, se pasó la muestra y se hicieron lavados con 50 mL de imidazol 35 mM.
13. Después, se eluyeron 2 mL de imidazol 250 mM, los cuales se dividieron en dos fracciones y, finalmente, se dio la colecta en fracciones de 2 mL de imidazol 500 mM.
14. Las fracciones colectadas se analizaron en SDS-PAGE al 12% y la cantidad de proteína se cuantificó por el método de Bradford.

9.6 Expresión y purificación de los fragmentos de caderina de *Aedes aegypti*: C13, G7 y G10

La expresión y purificación de los fragmentos de caderina se realizó siguiendo el mismo protocolo que para la ALP1.

9.7 Ensayo de la unión Cry4Ba-ALP1 mediante la prueba de ELISA

Se colocó 2.5 ng/ μ L por pozo de la ALP1 en la placa de ELISA (nuncTM). La placa se incubó a 4°C toda la noche. Cada pozo se lavó 3 veces con PBS-Tween al 0.1% y 2 veces con PBS1X. Posteriormente, los pozos fueron bloqueados con 200 μ L de BSA al 2% en PBS-Tween al 0.1%, a 37°C durante 2 horas. Los pozos se lavaron 2 veces con PBS1X y después, se incubaron con distintas concentraciones de toxina Cry4Ba en diluciones dobles seriadas (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.82, 3.91y 1.96 nM) durante 1h a 37°C. Posteriormente, se hicieron los lavados correspondientes (3 veces con PBS-Tween 0.1% y 3 veces con PBS1X) y la placa se incubó con el anticuerpo anti-Cry4Ba (1:10 000) por 1 hora. Posteriormente, se repitieron los lavados y la placa se incubó con el anticuerpo anti-conejo (1:10 000). Pasado este tiempo, la placa se lavó tres veces y se incubó durante 20 minutos con el sustrato (2 mM de o-fenildiamina, 0.7% de H₂O₂ en 0.1 M de una solución amortiguadora de fosfatos pH 5). La absorbancia a 490 nm se determinó en un lector de placas de ELISA. Con los resultados obtenidos se construyó una curva de saturación de la unión de Cry4Ba-ALP1 utilizando el programa GraphPad Prism para encontrar la concentración media de saturación de la unión entre estas dos proteínas (Fig. 12).

9.8 Ensayo de competencia de los péptidos sintéticos por la unión Cry4Ba-ALP1 (unión a ligando)

La toxina Cry4Ba se corrió en SDS-PAGE al 12% (3 μ g/pozo). Después, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 350 mA por 45 minutos. Pasado este tiempo, la membrana se lavó 20 minutos con PBS y después se bloqueó con leche desnatada al 5% (en PBS-Tween20 al 0.1%) durante 2 horas (Fig. 13). Por otra parte, mientras se bloqueaba la membrana, distintos excesos de péptidos sintéticos (1:250 y 1:500, respecto a la concentración de ALP1) fueron pre-incubados con 50 nM de ALP1 por 1h a temperatura ambiente. Después, se hicieron dos lavados de la membrana por 15 minutos y dos por 5 minutos con PBS-Tween20 al 0.1%.

Posteriormente, la membrana se incubó con la mezcla ALP1-péptidos sintéticos durante 1h a temperatura ambiente. Después de los lavados correspondientes, la membrana se incubó con el anticuerpo anti-histidinas acoplado a peroxidasa (1:5000) durante 1 hora. Pasado este tiempo, se enjuagó cinco veces la membrana con 30 mL de PBS1X por cinco minutos. La unión se reveló usando reactivos de luminiscencia (Fig. 14).

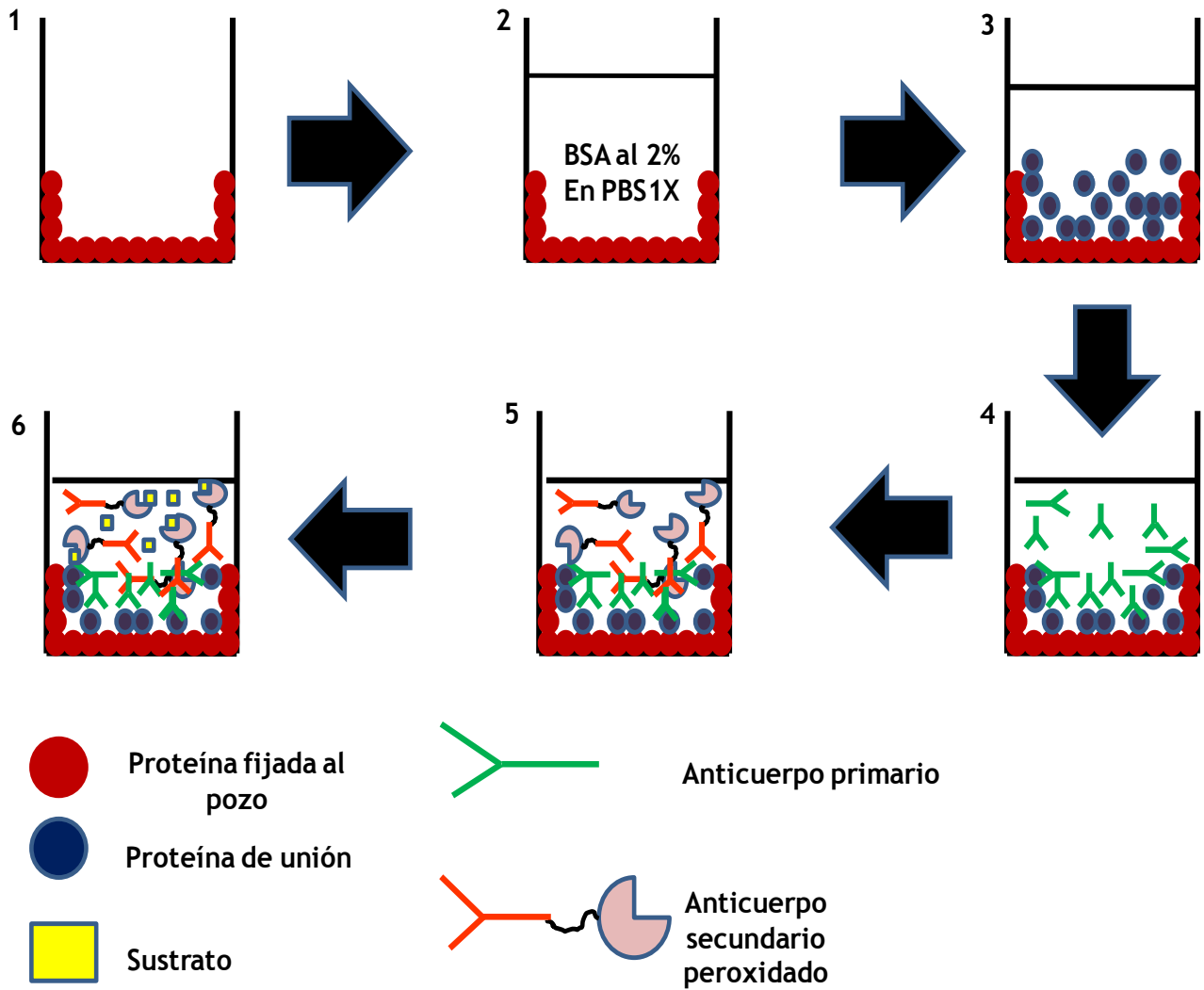


Figura 12. Representación esquemática del ensayo de ELISA. 1. Se fija la proteína de interés durante toda la noche a 4°C. 2. La placa de ELISA se bloquea con BSA al 2% en PBS1X (2 horas a 37°C). 3. Se incuba con la proteína de unión durante 1 hora a 37°C. 4. Se incuba durante una hora a 37°C con el anticuerpo primario. 5. Se incuba con el anticuerpo secundario peroxidado, 1 hora a 37°C. 6. Finalmente, se incuba con el sustrato. Entre cada paso existen 3 lavados con PBS-tween al 0.1% y 2 con PBS1X. La concentración de la proteína y la dilución en la cual se utilizan los anticuerpos varía dependiendo del experimento.

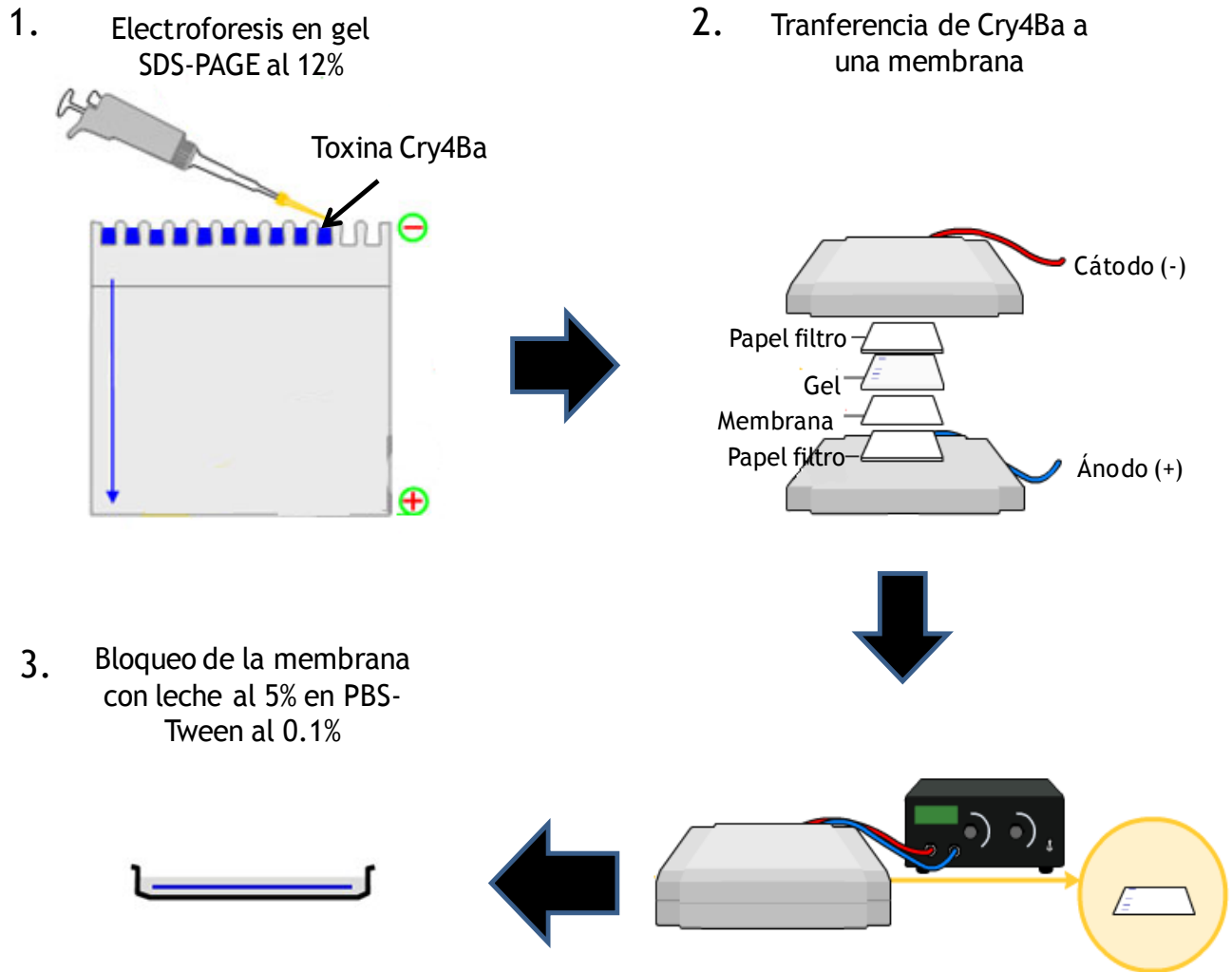


Figura 13. Representación esquemática de la transferencia a membrana de la toxina Cry4Ba. Los pasos de cada etapa son indicados, así como una breve descripción de cada uno de ellos.

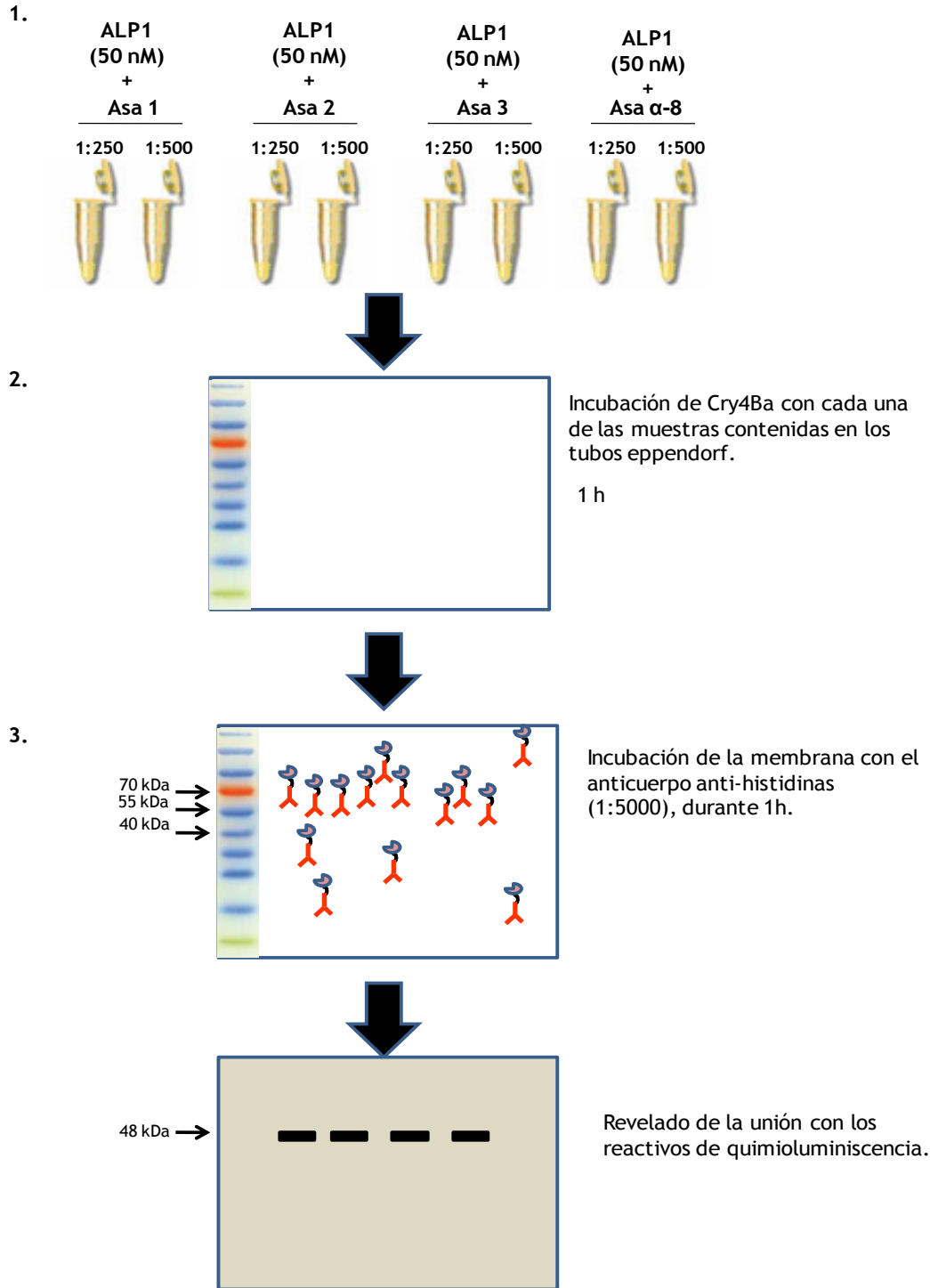


Figura 14. Ensayo de competencia de los péptidos sintéticos (correspondientes a las asas expuestas del dominio II de la toxina Cry4Ba) por la unión Cry4Ba-ALP1. El primer paso es una preincubación de cada uno de los péptidos sintéticos (concentraciones en exceso de 1:250 y 1:500 con respecto a la concentración de 50 nM de la ALP1) con la ALP1. Posteriormente, esta mezcla se incuba con la Cry4Ba durante 1 hora. El siguiente paso es la incubación con el anticuerpo anti-histidinas (1:5000) durante 1 hora y finalmente, el revelado de la unión con los reactivos de quimioluminiscencia.

9.9 Mutagénesis sitio dirigida

El método utilizado para realizar la mutagénesis sitio dirigida fue QuikChange™. El principio de esta técnica consiste en clonar un gen de la proteína de interés en un plásmido y usarlo para transformar una cepa *dam*⁺ de *E. coli* para que se metile. Una vez metilado, el plásmido se usa como templado en una reacción de PCR con un par de oligos complementarios que contengan una o más mutaciones deseadas. Más adelante, el producto de PCR será una mezcla de una cadena de DNA metilada y otra sin metilar. A continuación, la cadena metilada se elimina al tratar el producto de PCR con la endonucleasa DpnI (G^{me} A↓TC). Las muescas se reparan al transformar el plásmido en la cepa *XLI Blue* de *E. coli* (Fig. 15).

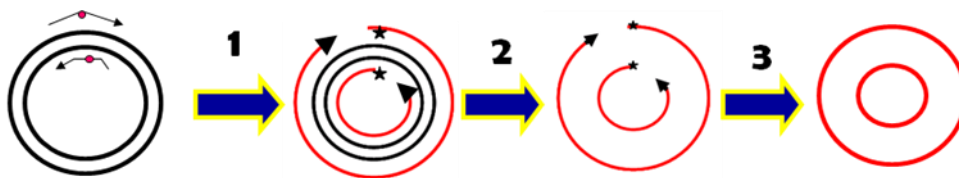


Figura 15. Esquema de la mutagénesis dirigida al sitio. (1) Dos oligos que contienen la mutación deseada (X), son usados en una reacción de PCR, generando un plásmido con muescas. (2) DpnI digiere las cadenas metiladas provenientes del templado. (3) El plásmido es usado para transformar células electrocompetentes para cubrir las muescas.

Los oligos utilizados para la construcción de cada mutante se presentan a continuación en la tabla 1.

Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')	Mutante
Fwα8M1	CA GCT TTA GTA GAA TCT CCT GCT GCT GCA TCT ATA GCA GCA CTG GAG GC	α8M1
Fwα8M2	GTA GAA TCT CCT TCT AGT AAA GCT GCA GCA GCA CTG GAG GCA GCA CTT AC	α8M2
Fwα8M3	CT AGT AAA TCT ATA GCA GCA GCG GCG GCA GCA CTT ACA CGA GAT GTT C	α8M3
FwL2M1	CT ATT GTT TAT AAA ACT TCT GCC GCA GCT ACT AGC TCC CCC TCT AAT CGA G	L2M1
FwL2M2	GTT TAT AAA ACT TCT ATC ACA GAT GCT GCC GCC CCC TCT AAT CGA GTT ACA AAA ATG	L2M2
FwL2M3	CT ATC ACA GAT ACT AGC TCC GCC GCT GCT CGA GTT ACA AAA ATG GAT TTC	L2M3
FwL2M4	GAT ACT AGC TCC CCC TCT AAT GCA GCT GCA GCA ATG GAT TTC TAC AAA ATT	L2M4

Tabla 1. Oligonucleótidos correspondientes a las asas 2 y α8 del dominio II de Cry4Ba a mutagenizar. Las letras en negritas indican los codones que codifican para alanina.

Las condiciones de mutagénesis usadas fueron:

Reacción de mutagénesis:

Componente	Cantidad adicionada
10x Buffer de reacción Quick change®	2.5µL
Agua MQ para un volume final de 25µL	X µL
Solución Quick	0.75 µL
Templado de DNA (doble cadena)	X µL (100ng)
Cebadores mutagénicos (100ng)	X µL
Mezcla dNTP´s	1 µL
Enzima Quick change	1 µL

Tabla 2 .Concentración de los componentes utilizados en la mutagénesis dirigida al sitio de Cry4Ba.

Condiciones del ciclo:

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95 °C	1 minuto
2	30	95 °C	1 minuto
		55 °C	1 minuto
		65 °C	2 minutos/kb plásmido

Tabla 3. Condiciones del ciclo utilizadas en la mutagénesis sitio dirigida de Cry4Ba.

Después de la PCR mutagénica, se adicionó 1µL de la enzima de restricción Dpn I (10U/µL) directamente a cada reacción de amplificación. Posteriormente, las mezclas fueron centrifugadas por un minuto y después incubadas a 37 °C por 1 hora para digerir a la cadena parental (no mutada).

Para la transformación de las células electrocompetentes se realizó lo siguiente:

- ✓ Por cada 1.5 μ L del DNA tratado con Dpn I para transformar, se usaron alícuotas de 45 μ L de células electrocompetentes. El DNA y las células se mezclaron mediante pipeteos suaves (arriba y abajo), procurando no formar burbujas.
- ✓ La mezcla se transfirió a celdas de 0.2 cm y se les aplicó un choque eléctrico (2.5V, 200 ohms).
- ✓ Las células electroporadas fueron recuperadas en medio SOC (SOB, glucosa y magnesio) por 1h/37°C con agitación.
- ✓ Posteriormente, se platearon 100 μ L de cada muestra en cajas de LB con ampicilina (100 μ g/mL) y se incubaron a 37°C/12h.
- ✓ De las colonias obtenidas, se picaron 5 por caja y se pasaron a medio líquido de LB con ampicilina (100 μ g/mL) y se incubaron toda la noche con agitación a 37°C/12h.
- ✓ Finalmente, se purificó el DNA plasmídico con el kit de QIAprep® (QIAGEN), se cuantificó y se mandó a secuenciar para conocer si las candidatas contenían la mutación deseada.

9.10 Transformación de *Bacillus thuringiensis*

Una vez que se analizó la secuencia del gen insertado en el plásmido de *E. coli* y se observó la mutación deseada, se procedió a transformar *Bacillus thuringiensis* con éste DNA para producir las toxinas mutantes.

1. La cepa de *B. thuringiensis* acristalífera 407 (no posee plásmido, no produce cristal) se creció en medio BHIG por 12 h a 30°C con agitación.
2. Posteriormente, el inóculo se centrifugó a 5000 rpm/5 minutos/4°C. La pastilla obtenida se resuspendió cuidadosamente en 30 mL de medio EB y se volvió a centrifugar utilizando las mismas condiciones.
3. La muestra se decantó y se resuspendió en 1.5 mL de EB.
4. Para la transformación, se mezclaron 250 μ L células electrocompetentes con 10 μ L de DNA con la mutación utilizando celdas de 0.4 cm.

5. Las celdas fueron incubadas en hielo por 5 minutos, después electroporadas (1000 Ω , 2.5 V) y regresadas al hielo por otros 5 minutos.
6. Las células se recuperaron a 37°C/1h en medio BHI. Posteriormente, se platearon 100 μ L de cada muestra en cajas de LB con eritromicina (5 μ g/mL) y se incubaron a 30°C/12h.
7. Las colonias crecidas fueron estriadas en cajas de LB/eritromicina (5 μ g/mL) e incubadas a 30°C por 72h.
8. La esporulación de las colonias con la mutación fue confirmada mediante su observación en el microscopio y la producción de cristal mediante SDS-PAGE al 12%.

9.11 Análisis de las mutantes de Cry4Ba

Las colonias de Bt, crecidas en medio LB sólido con eritromicina (5 μ g/mL), fueron inoculadas en medio líquido empleando la misma concentración de eritromicina (72h/30°C con agitación). Pasado este tiempo, las muestras fueron observadas al microscopio para comprobar la presencia de cristales en cada una de ellas. Posteriormente, las células centrifugadas fueron lavadas 3 veces con una solución de NaCl 0.3 M y EDTA 0.01 M a pH 8. Las células tratadas fueron resuspendidas en una solución de PMSF 1 mM y se corrieron en SDS-PAGE al 12%.

Por otra parte, se realizó una PCR de colonia con cada una de las mutantes obtenidas. Los componentes de la reacción y las condiciones para los 30 ciclos se muestran a continuación:

Componente	Cantidad
Templado	2 μ L
Buffer 10 X	2.5 μ L
Magnesio 25 mM	1.5 μ L
dNTP's (10 mM)	0.5 μ L
Oligos (F/R) 20 μ M (c/u)	0.5 μ L
Taq	0.2 μ L
Agua	Para 25 μ L de reacción

Tabla 4. Concentración de los componentes utilizados en la PCR de colonia de las mutantes de Cry4Ba obtenidas.

Condiciones del ciclo de PCR

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización	95	30 s
Alineamiento	55	30s
Extensión	72	1 min

Tabla 5. Condiciones del ciclo de la PCR de colonia de las mutantes de Cry4Ba obtenidas.

Oligonucleótidos utilizados

Oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'
Forward	GA GTT TGG AAT GAT TTC ATG ACC AAT ACA GGG
Reverse	GGC CGG AAC TTG TGT GAT AGC

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en la PCR de colonia de las mutantes de Cry4Ba obtenidas.

Los DNA's obtenidos fueron cuantificados utilizando el nano-drop (Thermo Sciencies) y posteriormente, se mandaron a secuenciar para comprobar que las mutaciones estaban en *Bacillus thuringiensis*.

9.12 Análisis de la solubilización y activación de las mutantes de Cry4Ba

Las mutantes obtenidas fueron solubilizadas y posteriormente activadas mediante el procedimiento mencionado con anterioridad. Las muestras fueron cargadas en SDS-PAGE al 12% y teñidas con Coomassie para detectar la presencia de las protoxinas y toxinas.

9.13 Bioensayos en larvas de *Aedes aegypti*

Diez larvas de *Aedes aegypti* de 4to. instar fueron colocadas en 100 mL de agua declorada. Posteriormente, se probaron diferentes concentraciones de la espora-cristal de Cry4Ba silvestre y de sus mutantes (1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 y 1500 ng/mL), durante un período de 24 h a

28°C. El efecto tóxico fue determinado mediante el conteo de larvas muertas. El ensayo fue hecho por triplicado. Con los resultados obtenidos se determinó la LC50 utilizando el programa PROBIT.

9.14 Preparación de las vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA)

Las VMMA fueron preparadas a partir de insectos disectados de larvas de *A. aegypti* del cuarto estadio. Los intestinos disectados fueron colocados en una solución MET (300 mM de manitol, 5 mM de EGTA y 20 mM de Tris-HCl pH 7.4) y almacenados a -70°C hasta la preparación de las VMMA.

Para la preparación de las VMMA, los intestinos se descongelaron y el tejido se rompió con la ayuda de un homogeneizador Doucer. Al homogenado se le agregó MgCl₂ 240 mM, para una concentración final de 12 mM de MgCl₂, y se dejó reposar en hielo durante 20 min. La mezcla entonces se centrifugó a 3000 x g durante 15 minutos a 2°C. El sobrenadante se recuperó manteniéndose en hielo y la pastilla se resuspendió en la solución MET para volverse a tratar.

Los sobrenadantes obtenidos se centrifugaron a 100000 x g por 10 minutos a 2°C. La pastilla resultante se resuspendió en solución MET (1µL por intestino inicial), se cuantificó por el método de Bradford, y se prepararon alícuotas, las cuales se almacenaron a -70°C.

9.15 Ensayo de unión de la Cry4Ba silvestre y sus mutantes a las VMMA´s

Se incubaron 10 µg de VMMA con una concentración de 5 nM de las toxinas Cry4Ba silvestre y de sus mutantes en un volumen de 100 µL (solución de BSA 0.1% en PBS-Tween 20 0.1%), a temperatura ambiente, por una hora. La toxina no unida fue removida centrifugando a 14000 xg, 10 minutos a 25°C. La pastilla (VMMA + la toxina unida) fue lavada dos veces con BSA 0.1% en PBS-Tween 20 al 0.1% y posteriormente resuspendida en PBS. Las muestras fueron separadas en SDS-PAGE al 12% y transferidas a una membrana de PVDF a 350 mA por 45 minutos. La membrana se lavó con PBS y fue bloqueada con PBS-Tween 20 al 2% durante 20 minutos. La membrana se lavó con PBS y se incubó una hora con el anticuerpo anti-Cry4Ba (1:100 000 v/v). Pasado este tiempo, la membrana se lavó con PBS-Tween20 al 0.1%, 1 lavado de 15 minutos y 2 lavados de 5 minutos. Después, la membrana fue incubada con el anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa (1:5000 v/v) por una hora. Terminado este tiempo, se

hicieron los lavados correspondientes a la membrana y se incubó con los reactivos de quimioluminiscencia siguiendo la recomendación del fabricante (Fig. 16).

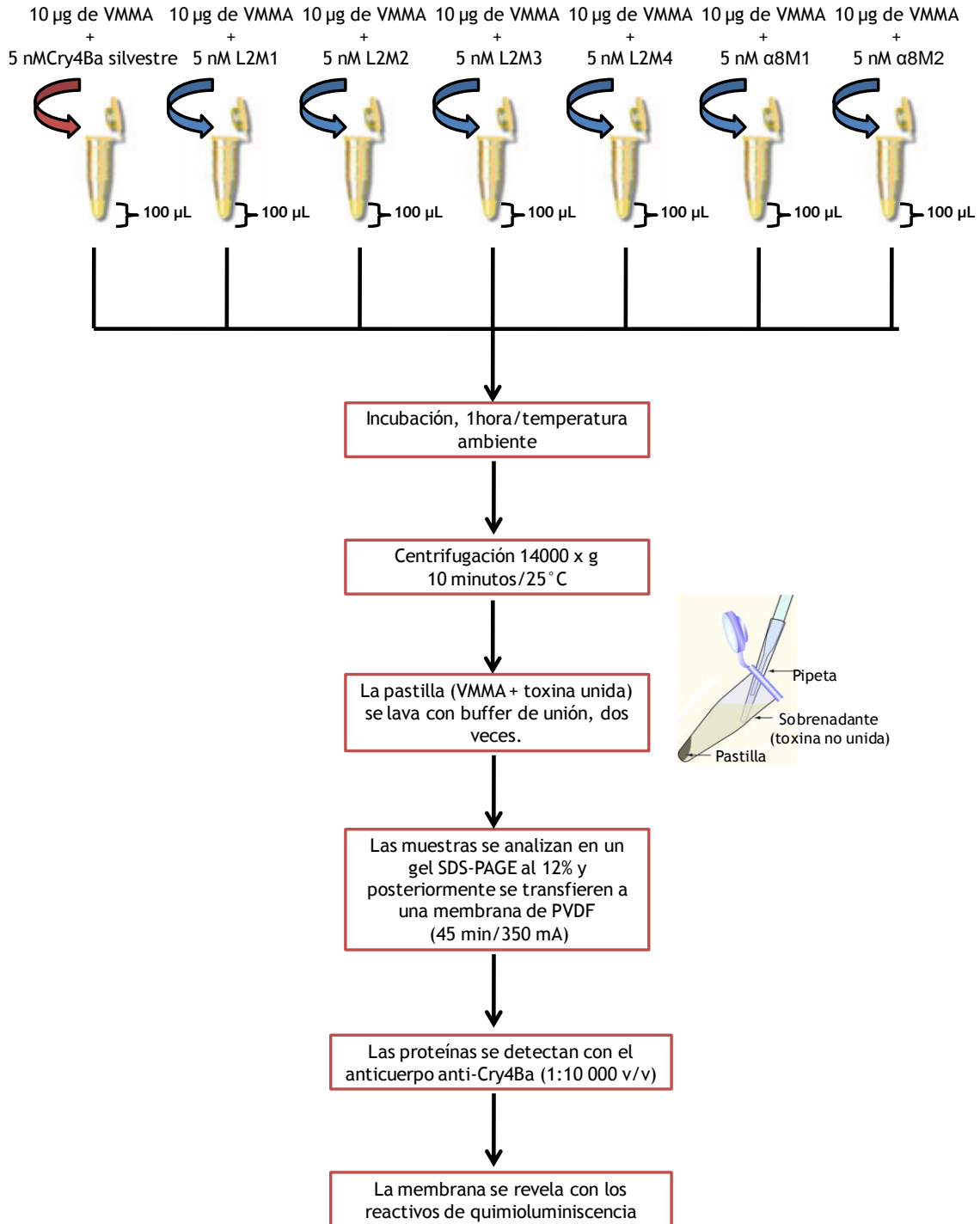


Figura 16. Representación esquemática del experimento de unión de la toxina Cry4Ba silvestre y sus mutantes a las VMMA de *Aedes aegypti*.

9.16 Análisis de la unión de Cry4Ba silvestre y sus mutantes a la ALP1 mediante ensayo de unión a ligando

Se cargaron 3 µg por pozo de la ALP1 en SDS-PAGE al 12%. Posteriormente, el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa (350 mA, 1.5 h). Después, la membrana fue bloqueada con leche al 5% en PBS-Tween20 al 0.1% durante 2 h y lavada con PBS-Tween20 al 0.1% (1 lavado de 15 minutos, 2 lavados de 5 minutos). Se usaron concentraciones de 5 nM de cada toxina para incubar a la membrana durante 1 hora. Pasado este tiempo, se hicieron los lavados correspondientes y la membrana fue incubada con el anticuerpo anti-Cry4Ba (1:100000 v/v) por una hora. Se hicieron tres lavados con PBS-Tween20 al 0.1% y se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (1:5000 v/v) por 1 h. Finalmente, la membrana fue lavada e incubada con los reactivos de quimioluminiscencia.

9.17 Análisis de la unión de Cry4Ba silvestre y sus mutantes a la ALP1 mediante ELISA

Se colocó 2.5 ng/µL por pozo de Cry4Ba y sus mutantes a la placa de ELISA. La placa se incubó a 4°C toda la noche. Cada pozo se lavó 3 veces con PBS-Tween al 0.1% y 2 veces con PBS1X. Posteriormente, los pozos fueron bloqueados con 200 µL de BSA al 2% en PBS-Tween al 0.1%, a 37°C durante 2 horas. Los pozos se lavaron 2 veces con PBS1X y después, se incubaron con 50 nM de la ALP1 durante 1h a 37°C. Posteriormente, se hicieron los lavados correspondientes (3 veces con PBS-Tween 0.1% y 3 veces con PBS1X) y la placa se incubó con el anticuerpo anti-histidinas acoplado a peroxidasa (QIAGEN) (1:5000) por 1 hora. Pasado este tiempo, la placa se lavó por triplicado y se incubó durante 20 minutos con el sustrato (2 mM de o-fenildiamina, 0.7% de H₂O₂ en 0.1 M de una solución amortiguadora de fosfatos pH 5). La absorbancia a 490 nm se determinó en un lector de placas de ELISA. Los resultados fueron posteriormente graficados.

9.18 Análisis de la unión de Cry4Ba a los fragmentos de caderina C13, G7 y G10 de *Aedes aegypti*

Se llevó a cabo una prueba de ELISA para analizar la unión de Cry4Ba a los tres fragmentos de caderina: C13, G7 y G10, siguiendo el mismo protocolo anteriormente mencionado. Se fijaron a la placa de ELISA 2.5 ng/µL de cada uno de los fragmentos mencionados. Los pozos se lavaron 2 veces con PBS1X y después, se incubaron con 125 nM de toxina Cry4Ba durante 1h a 37°C. Posteriormente, se hicieron los

lavados correspondientes (3 veces con PBS-Tween 0.1% y 3 veces con PBS1X) y la placa se incubó con el anticuerpo anti-Cry4Ba (1:10 000) por 1 hora. Posteriormente, se repitieron los lavados y la placa se incubó con el anticuerpo anti-conejo (1:10 000). Pasado este tiempo, la placa se lavó por triplicado y se incubó durante 20 minutos con el sustrato (2 mM de o-fenildiamina, 0.7% de H₂O₂ en 0.1 M de una solución amortiguadora de fosfatos pH 5). La absorbancia a 490 nm se determinó en un lector de placas de ELISA.

9.19 Unión de la Cry4Ba y sus mutantes al fragmento G10 de caderina de *Aedes aegypti* (ELISA)

Se fijaron 2.5 ng/μL de la toxina Cry4Ba y sus mutantes a la placa de ELISA a 4°C durante 12 h. Posteriormente, la placa se incubó con 100 nM del fragmento G10 de caderina durante 1h a 37°C. Como anticuerpo se utilizó un anti-histidinas (Penta-His, QIAGEN) acoplado a peroxidasa, en una concentración 1:5000 (1h a 37°C). Pasado este tiempo, la placa se incubó durante 10 minutos con el sustrato (2 mM de o-fenildiamina, 0.7% de H₂O₂ en 0.1 M de una solución amortiguadora de fosfatos pH 5). La absorbancia a 490 nm se determinó en un lector de placas de ELISA. Los resultados obtenidos fueron graficados en el programa Excel.

9.20 Análisis de la unión de Cry4Ba a la Cyt1Aa (ELISA)

Para el ELISA se colocó 2.5 ng/μL por pozo de la Cyt1Aa en la placa de ELISA. Las concentraciones de Cry4Ba probadas fueron en diluciones dobles seriadas (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.82, 3.91 y 1.96 nM). La técnica ya se ha explicado anteriormente para la ALP1. Con los resultados obtenidos se construyó una curva de saturación de la unión de Cry4Ba-Cyt1Aa utilizando el programa GraphPad Prism para encontrar la concentración media de saturación de la unión entre estas dos proteínas.

9.21 Análisis de la unión de Cry4Ba y sus mutantes a la Cyt1Aa (ELISA)

Mediante ensayo de ELISA se probó la unión de las mutantes de Cry4Ba a la Cyt1Aa. Se fijaron 2.5 ng/μL de la Cyt1Aa en la placa de ELISA y posteriormente, cada pozo fue incubado con 75nM de Cry4Ba y sus mutantes. Se utilizó el primario anticuerpo anti-Cry4Ba (1:10 000) y el anticuerpo anti-conejo (1:10 000) como secundario. La lectura se realizó conforme al experimento 9.21.

10. RESULTADOS

10.1 Purificación, solubilización y activación de Cry4Ba, Cry11Aa y Cyt1Aa.

La obtención de los cristales de Cry4Ba, Cry11Aa y Cyt1Aa se llevó a cabo de la manera en que fue descrito con anterioridad en materiales y métodos. Sus protoxinas solubles y toxinas fueron analizadas en SDS-PAGE al 12%, el cual se tiñó posteriormente con el colorante azul de Coomassie. Se ha reportado en la literatura que la protoxina de Cry4Ba de 130kDa, una vez que es activada con tripsina, genera dos fragmentos que son resistentes al corte con esta serin-proteasa: uno de 48 kDa y otro de 16 kDa; los cuales permanecen asociados y retienen toxicidad (Angsuthanasombat *et al.*, 1993; Komano *et al.*, 1998). En el caso de la protoxina de Cry11Aa de 70 kDa, también se generan dos fragmentos resistentes a tripsina, uno de 36 kDa y otro de 32 kDa (Dai *et al.*, 1993). Finalmente, la protoxina de 27 kDa de Cyt1Aa genera un fragmento resistente a proteinasa K de 23 kDa (Du *et al.*, 1999) (Fig. 17).

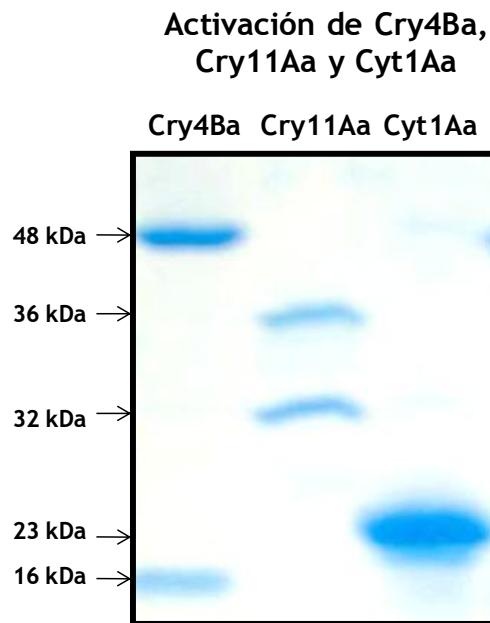


Figura 17. SDS-PAGE al 12% teñido con Coomassie. Muestra la activación de Cry4Ba, Cry11Aa y Cyt1Aa.

Como puede apreciarse, todas las toxinas de Cry4Ba, Cry11Aa y Cyt1Aa, fueron satisfactoriamente obtenidas.

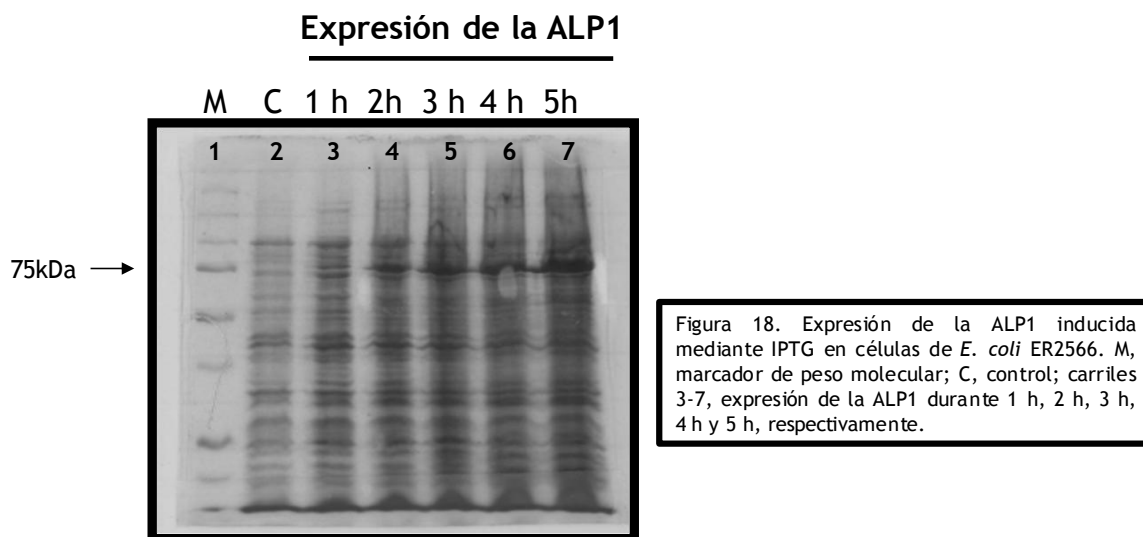
10.2 Expresión de la fosfatasa alcalina (ALP1)

La ALP1 es una isoforma de la fosfatasa alcalina encontrada en el intestino de *Aedes aegypti*. Consiste de 542 aminoácidos, de los cuáles los primeros 23 pertenecen al péptido señal N-terminal que conduce a la proteína al retículo endoplásmico. También posee un péptido señal de 27 aminoácidos en el C-terminal, el cual se remueve para insertar el ancla de GPI.

Para la expresión de la ALP1 se usó el vector pET-32b, el cuál posee un promotor fuerte (T7), una proteína de fusión (tioredoxina) en el C-terminal y una cola de histidinas (6 x His) en el N-terminal (Fernández *et al.*, 2009).

La expresión de la cepa de *E. coli* ER2566, transformada con el vector pET-32b, se realizó en el medio de cultivo 2xTY-ampicilina con 1 mM de IPTG a 30°C, durante 5 horas a 250 rpm. Se recolectó un mililitro del medio de cultivo cada hora hasta completar las 5 horas de incubación con la finalidad de monitorear la expresión de la proteína. En la figura 18 se puede apreciar la cinética de expresión de ALP1, la cual se observa como una banda de 75 kDa que corresponde al tamaño esperado.

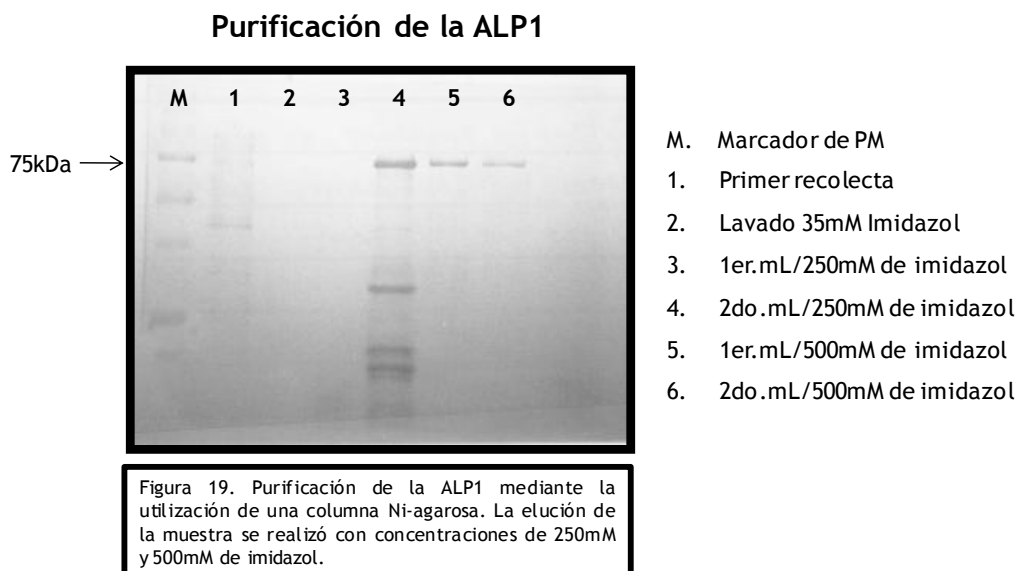
En SDS-PAGE al 12% se cargaron 15µL de cada una de las muestras tomadas con una hora de diferencia hasta completar las 5 horas de incubación del cultivo.



Después de teñir el gel con azul de Coomassie, se pudo apreciar que la expresión de ALP1 (6xHis) incrementó con el tiempo de inducción.

10.3 Purificación de la ALP1

Debido a que la ALP1 posee una cola de histidinas en el extremo N-terminal, pudo ser purificada por afinidad en una columna de níquel-agarosa. La elución de dicha proteína se realizó en condiciones desnaturizantes (8 M de urea), utilizando distintas concentraciones de imidazol (ver materiales y métodos). Una vez que se recolectaron cada uno de las fracciones, se cargaron 15 μ L en SDS-PAGE al 12%. Como puede observarse en la figura 19, en las últimas dos fracciones (500 mM de imidazol) se observa la ALP1 más pura. Con base a esto, se utilizó esta fracción como muestra para la realización de los experimentos posteriores. Cabe mencionar que en el carril 4 se observan otras bandas más pequeñas de 75 kDa, las cuales podrían ser producto de contaminación de otras proteínas en la muestra.



10.4 Expresión y purificación de los fragmentos de caderina C13, G7 y G10 de *Aedes aegypti*

Como se había indicado anteriormente en el protocolo de expresión y purificación, de materiales y métodos, el procedimiento seguido para la obtención de estos fragmentos de caderina fue el mismo que para el de la ALP1 (Fig. 18 y Fig. 19).

En este caso, se obtuvieron dos fracciones de cada fragmento al eluir con 250 mM de imidazol. En el caso del fragmento C13 y G7 se recuperaron las 2das. fracciones y en el caso del G10, la primer fracción.

Expresión y purificación de los fragmentos de caderina: C13, G7 y G10

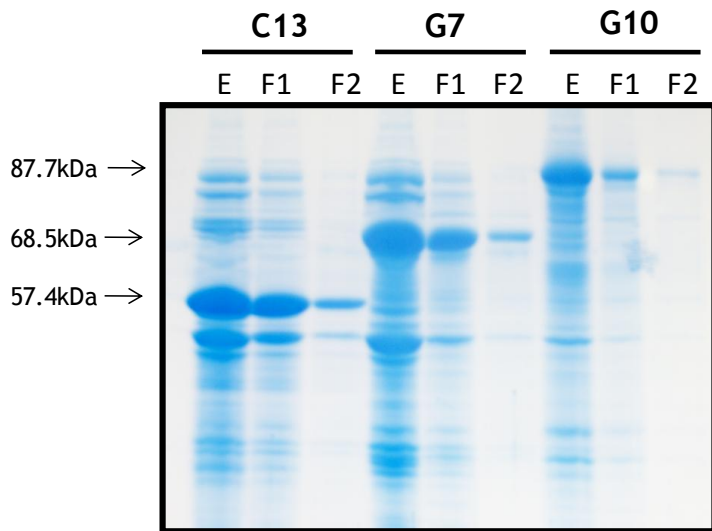


Figura 20. Análisis de la expresión y purificación de los fragmentos de caderina de *Aedes aegypti*: C13, G7 y G10 en SDS-PAGE al 12%. E, expresión del fragmento de caderina a las 5 horas después de la inducción con 1 mM de IPTG; F1, 1er. fracción de 250 mM de imidazol; F2, 2da. fracción de 250 mM de imidazol.

En el gel teñido con Coomassie se puede apreciar que cada uno de los fragmentos fue expresado y purificado apropiadamente, ya que cada banda corresponde con el tamaño esperado (Fig. 20). Cada uno de los fragmentos fue cuantificado por el método de Bradford para su posterior análisis en los experimentos de ELISA.

10.5 Unión de Cry4Ba a la ALP1 mediante ELISA

Para realizar los experimentos de unión de la Cry4Ba y sus mutantes a la ALP1, fue necesario construir primero una curva de saturación de la unión de la Cry4Ba silvestre a la ALP1. La idea de esta curva fue que nos permitiera encontrar una concentración media de saturación de dicha unión para probar, mediante un experimento de ELISA posterior, si alguna de las mutantes de Cry4Ba estaba afectada en unión a la ALP1. Con la idea de abarcar un amplio rango de concentraciones en de Cry4Ba, se realizaron diluciones dobles seriadas de esta toxina comenzando desde 1.96 nM hasta 1000 nM, en total 10 concentraciones. Una vez que el experimento fue realizado por triplicado, se promediaron las absorbancias correspondientes a cada concentración de toxina y se obtuvieron sus desviaciones estándar. Al valor de promedio se le restó el control negativo utilizado para cada muestra; es decir, el pozo sin haber sido incubado con ALP1, con BSA al 2% en PBS1X e incubado con cada una de las

concentraciones indicadas de Cry4Ba y de los anticuerpos antiCry4Ba y anticonejo (en las diluciones mencionadas en materiales y métodos). En otras palabras, el control negativo siguió el mismo tratamiento que los pozos analizados, excepto la incubación con ALP1.

Al capturar y graficar los datos obtenidos en el programa “Graph Pad Prism” se obtuvo una concentración de saturación de la unión Cry4Ba-ALP1 media de 232.4nM y un valor R^2 de 0.9870 al realizar el ajuste de línea recta, lo que significó que nuestros datos fueron confiables (Fig. 21).

Curva de saturación de la unión Cry4Ba-ALP1

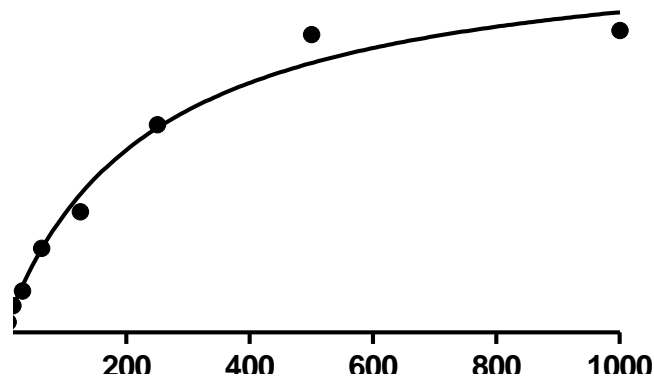


Figura 21. Curva de saturación de la unión Cry4Ba-ALP1 mediante la prueba de ELISA. 2.5ng/ μ L de ALP1 por pozo fueron fijados a la placa durante toda la noche a 4°C. Las concentraciones de Cry4Ba utilizadas fueron desde 1000nM a 1.96nM (utilizando diluciones dobles seriadas). El anticuerpo primario utilizado fue antiCry4Ba (1:10 000) y como secundario anti-conejo (1:10 000).

10.6 Ensayo de competencia de los péptidos sintéticos por la unión Cry4Ba-ALP1 (Far Western-blot)

Para la construcción de los péptidos sintéticos se analizó la estructura tridimensional de la toxina Cry4Ba, enfocándonos especialmente en el dominio II; el cual se sabe es el responsable de la interacción de muchas toxinas Cry con sus proteínas receptoras. En la toxina Cry4Ba, este dominio se extiende desde el aminoácido 283 hasta el 466, presenta una estructura β -prisma compuesto de tres láminas β antiparalelas. La lámina I está formada por las hebras β 5, β 2, β 3, y β 4; la lámina II por β 8, β 7, β 6 y β 9 y finalmente, la lámina III por tres hebras β 1, β 11 y β 10. Todas ellas en conjunto con la hélice α -8 forman el motivo de llave griega (Boonserm *et al.*, 2005) (Fig. 22).

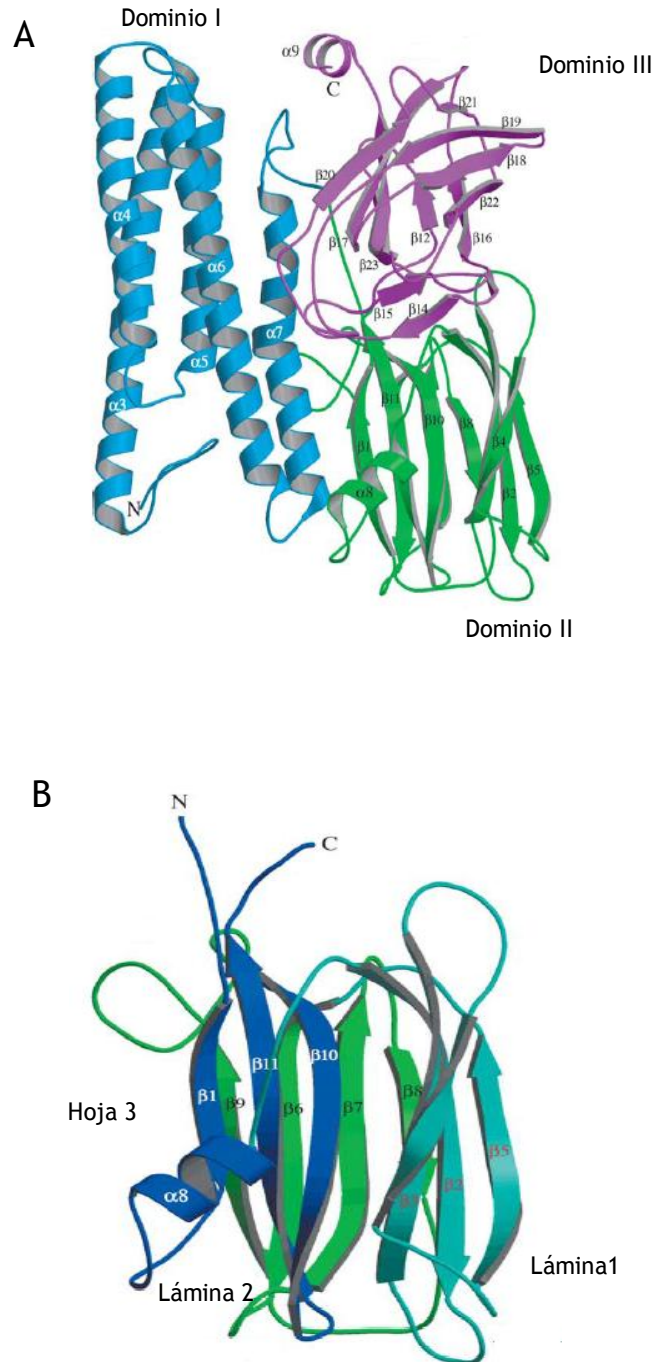


Figura 22. A. Estructura tridimensional de la toxina Cry4Ba mostrando sus tres dominios. B. En la parte derecha se muestra el dominio II compuesto de tres láminas B antiparalelas formando un motivo tipo llave griega. Los residuos comprendidos entre cada hebra son: B1 (290-295), B2 (319-329), B3 (338, 347), B4 (354-360), B5 (366-373), B6 (378-386), B7 (393-400), B8 (405, 409), B9 (419-425), B10 (443-453), B11 (457, 466) y la hélice $\alpha 8$ (304-312) (Boonserm *et al.*, 2005).

Por los antecedentes mencionados, se sabe que en las toxinas Cry, así como en otras toxinas formadoras de poro, las asas expuestas del dominio II juegan un papel importante en la interacción con sus proteínas receptoras (Soberón *et al.*, 2007). Por ello, se decidió trabajar con péptidos sintéticos correspondientes a estas asas del dominio II de la toxina Cry4Ba: $\alpha 8$, 1, 2 y 3 (tabla 7).

Asa	Secuencia
1	327 W T N T I Y Q D L R F L 338 B2
2	383 I T D T <u>S S P S</u> N R V T K M 396 B6 B7
3	446 S Y I K T D V I D Y N S N R 459 B10 B11
α -8	300 <u>S S K S I A A L E</u> 308 Hélice $\alpha 8$

Tabla 7. Péptidos sintéticos correspondientes a las asas expuestas del dominio II flanqueados por pequeñas regiones de hebras β de la toxina Cry4Ba (1,2,3 y $\alpha 8$). Las regiones subrayadas corresponden únicamente a los aminoácidos abarcados por las asas correspondientes, las regiones no subrayadas corresponden las regiones de hebras β que limitan a cada asa.

En un experimento de unión a ligando, se realizó un ensayo de competencia de estos péptidos sintéticos por la unión Cry4Ba-ALP1 mediante “Far Western-blot”.

50nM de ALP1 fue preincubada con dos concentraciones en exceso (con respecto a la concentración de ALP1) de cada uno de los péptidos sintéticos (1:250 y 1:500). Posteriormente, una membrana de nitrocelulosa con la Cry4Ba fue incubada durante 1h con esta mezcla. Para revelar la unión se utilizó un anticuerpo anti-histidinas acoplado a peroxidasa (1:5000). El experimento se repitió tres veces y se seleccionó el más representativo.

Lo que esperábamos en este experimento era que la importancia de alguna(s) de la(s) asa(s) se reflejaría en la interacción de sus péptidos con la ALP1, lo que produciría una disminución en la unión de la ALP1 con la Cry4Ba.

En el carril 1 de la figura 23 se encuentra el control positivo, representado únicamente por la unión Cry4Ba-ALP1. En los carriles del 2 al 8 también se encuentra presente esta banda de 48kDa, lo que indica que los péptidos no interaccionaron con la ALP1, por lo que no pudieron competir contra la Cry4Ba por la unión a la ALP1; sin embargo, en el carril 9 ya no se observa ninguna banda (asa $\alpha 8$,

exceso 1:500), lo que pudiese ser un buen indicio de que esta asa probablemente está involucrada en la interacción de Cry4Ba con el receptor fosfatasa alcalina.

Otro dato curioso que es importante hacer notar es que en los carriles 4 y 5, correspondientes a la competencia del asa 2 con ambos excesos: 1:250 y 1:500, se ve un incremento notable en la unión de la toxina Cry4Ba a la ALP1. Lo mismo sucede, pero de manera menos intensa, en los carriles 6, 7 y 8 (competencia con el péptido del asa 3 en ambos excesos y con el péptido del asa α -8 en el exceso 1:250).

Esto pudiese tener algunas explicaciones:

1. En un ensayo de unión a ligando (“Far Western blot”), la proteína analizada mediante SDS-PAGE (Cry4Ba) se encuentra en un estado desnaturalizado, lo que significa que pudiese exponer un mayor número de regiones en la proteína. Es decir, no correspondería completamente a su contexto natural.
2. La conformación que pudiesen adoptar los péptidos sintéticos en solución puede variar. Depende en gran medida de la polaridad del ambiente, el número de aminoácidos presentes en el péptido y el carácter de cada aminoácido (con o sin carga).
3. El péptido correspondiente al asa expuesta del dominio II de la toxina Cry4Ba (asa 2 y 3) pudiese estar potencializando la unión Cry4Ba a la ALP1, es decir, pudiera actuar como un mediador de la interacción Cry4Ba-ALP1; probablemente, al ejercer un cambio conformacional en la ALP1 que permita la exposición de un mayor número de sitios de unión.

La idea de este experimento era la de realizar una selección del (las) asa (s) del dominio II de Cry4Ba que se mutagenizarían para analizar la unión a sus moléculas receptoras. Claramente se observa que la única asa que compite la unión Cry4Ba-ALP1 es el α 8, por lo que su selección fue sencilla; sin embargo, en vez de construir solamente 3 mutantes del asa α -8, también se decidió mutagenizar el asa 2 (a pesar de que no compitió la unión). Se tomó esta determinación debido a que en la literatura existen diversos reportes donde se demuestra que el asa 2 del dominio II de toxinas Cry de lepidópteros y dípteros, principalmente, es importante para la interacción con sus moléculas receptoras.

Cabe mencionar que este experimento sólo es un indicativo de lo que pudiese estar pasando realmente en la interacción entre Cry4Ba-ALP1, es un acercamiento a su bioquímica de la interacción.

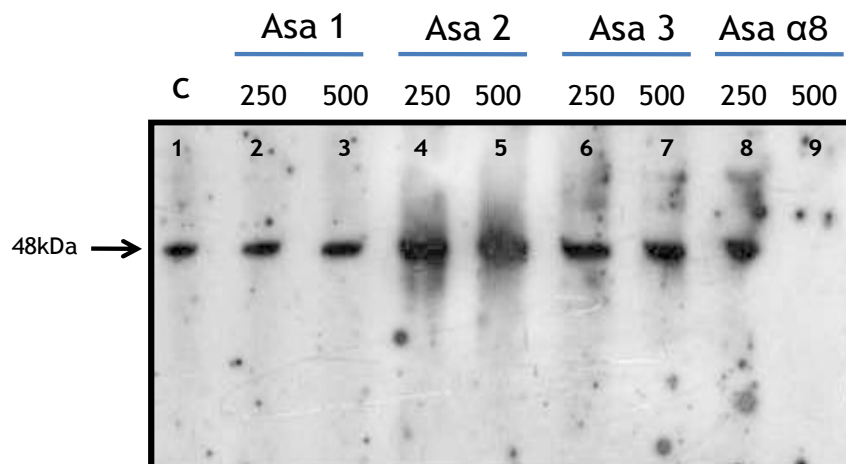


Figura 23. Ensayo de unión a ligando (Far western-blot). Competencia de los péptidos sintéticos por la unión de Cry4Ba a la ALP1. En SDS-PAGE al 12% se corrió 3 μ g de la toxina Cry4Ba/pozo. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (350mA/1h) y posteriormente se incubó con la ALP1 (carril1) y con la ALP1 preincubada con cada uno de los péptidos sintéticos a la concentración correspondiente.

10.7 Mutagénesis sitio dirigida

Con los experimentos realizados hasta el momento, se planteó la construcción de 7 mutantes, 3 en el asa α -8 y 4 en el asa 2 de Cry4Ba (Fig. 24).

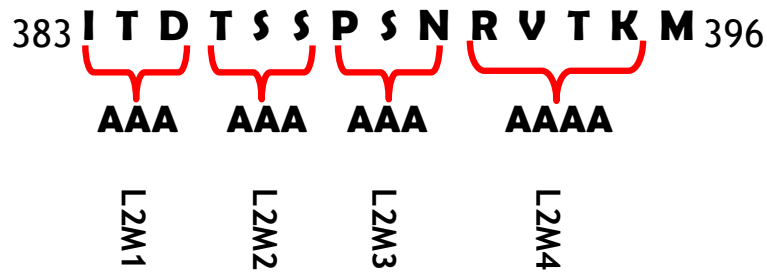
La mutagénesis se llevó a cabo utilizando el método Quick Change (Stratagene) siguiendo el procedimiento sugerido. Después de confirmar la presencia de mutantes en *E. coli* por secuenciación, se procedió a hacer la transformación del plásmido que contenía la mutación deseada a la cepa de *Bacillus thuringiensis* acristalífera serotipo 1 407. Esta cepa de *Bt* se caracteriza por no poseer un plásmido que contenga el gen *cry*, por lo que no produce espora-cristal.

Para asegurarse de que se había hecho una transformación efectiva, se realizó un PCR de colonia con cada una de las mutantes obtenidas. Posteriormente, estas muestras fueron observadas en un gel de agarosa al 2% como se muestra a continuación (Fig. 25).

El tamaño de la banda correspondió con el esperado, lo que nos indicó que la cepa acristalífera de *Bacillus thuringiensis* se transformó satisfactoriamente. Al igual que para *E. coli*, se mandó a secuenciar

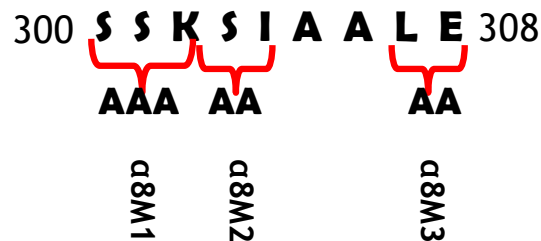
la región del plásmido que contenía al gen de Cry4Ba con la mutación deseada, esto con el objetivo de asegurar que se tuvieran todas las mutantes planeadas.

a



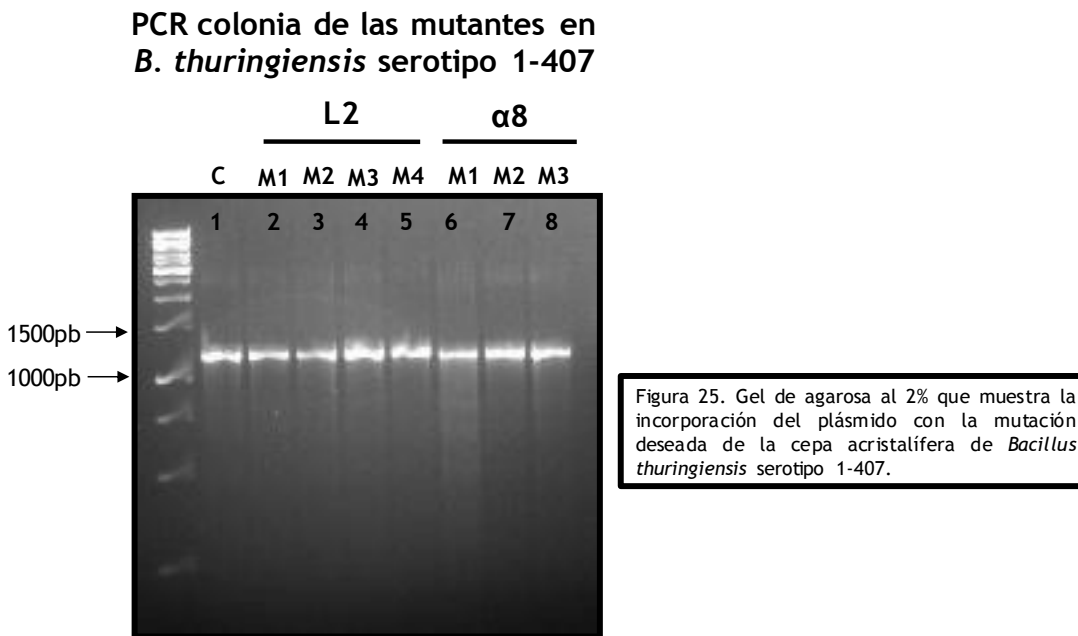
Mutante	Secuencia
1 L2M1	AAA T S S P S N R V T K M
2 L2M2	I T D AAA P S N R V T K M
3 L2M3	I T D T S S AAA R V T K M
4 L2M4	I T D T S S P S N AAA A M

b



Mutante	Secuencia
1 α8M1	AAA S I A A L E
2 α8M2	S S K A A A L E
3 α8M3	S S K S I A A A A

Figura 24. Representación de la construcción de las mutantes de Cry4Ba. a) 3 en el asa α8. b) 4 en el asa 2.



Después de corroborar ésto, la cepa de *Bt* serotipo 1-407 (con su plásmido) se hizo crecer en medio SP con eritromicina (5 μ g/mL) a 30°C /72h con agitación hasta completar esporulación. Después de purificar las protoxinas mutantes, se analizó su solubilización y activación *in vitro* con la idea de ver si alguna de ellas, estaba afectada en alguna de estas dos etapas cruciales para el proceso de intoxicación de la larva de *Aedes aegypti*.

10.8 Análisis de la solubilización y activación de las mutantes de Cry4Ba

La idea de analizar la solubilización y activación de las mutantes de Cry4Ba fue para conocer si la sustitución de los aminoácidos en las asas 2 y α -8 del dominio II tuvo algún efecto significativo en la estructura secundaria de la toxina Cry4Ba (Fig. 26 y 27).

Como puede observarse en la figura 26, todas las mutantes presentaron un patrón de solubilización semejante al de la toxina silvestre, excepto por la mutante α 8M3; la cual solubilizó de manera ineficiente. Debido a éste problema, se intentó probar con otras clonas que expresaran esta misma mutante, el resultado fue el mismo para todas.

En el caso de la activación (Fig. 27), las 4 mutantes del asa 2 (L2M1, L2M2, L2M3 y L2M4) y las 2 mutantes del asa α -8 (α 8M1 y α 8M2) fueron procesadas en dos fragmentos resistentes a tripsina, 46-48kDa y 16kDa, de la misma manera en que se procesa la Cry4Ba silvestre.

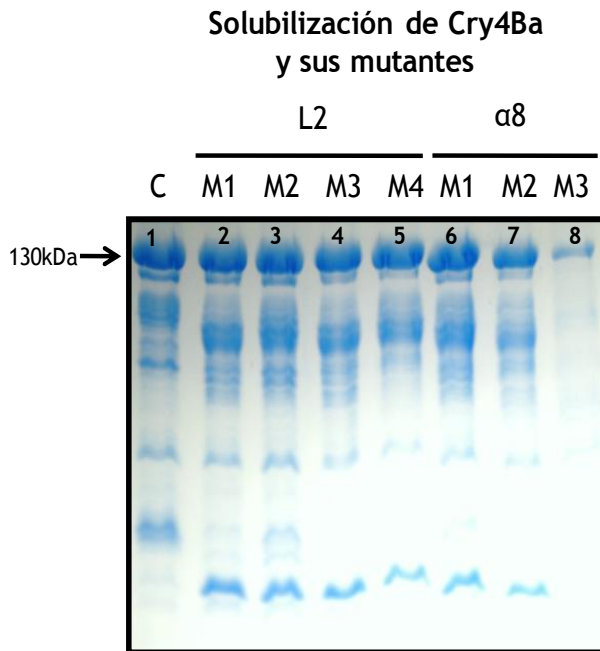


Figura 26 Gel SDS-PAGE al 12% teñido con Coomassie. Solubilización de Cry4Ba y sus mutantes. Se cargaron 3µg de muestra por pozo.

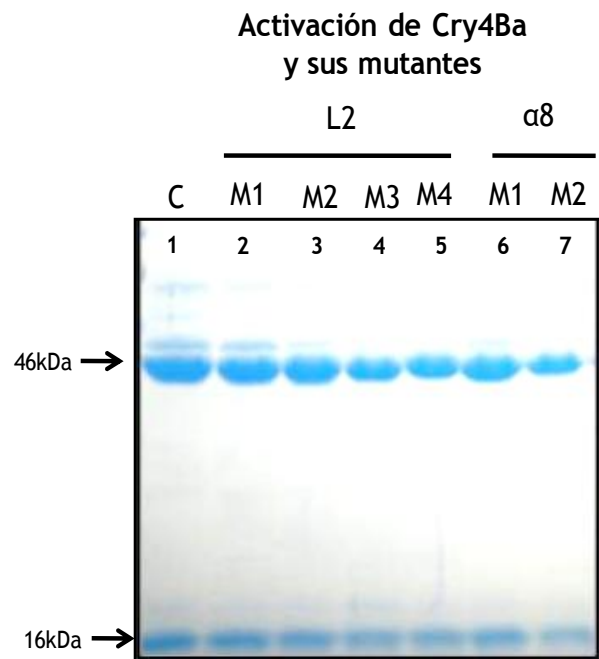


Figura 27. Gel SDS-PAGE al 12% teñido con Coomassie. Activación de Cry4Ba y sus mutantes. Se cargaron 3µg de muestra por pozo.

También se intentó activar a la mutante $\alpha 8M3$ con la poca cantidad de protoxina que pudo ser solubilizada. Esta se cuantificó por el método de Bradford para ser incubada con la tripsina, de la misma manera que para las otras mutantes. Al ser analizada en SDS-PAGE al 12% se observó una banda de 48 kDa muy delgada en comparación con la generada por las otras mutantes, a pesar que la concentración de proteína fue la misma en todos los carriles. Esto sugiere que el cambio de aminoácidos en la región 307LE308 realmente afectó la estructura secundaria en la proteína. Esto indica que 6 de las 7 mutantes construidas fueron producidas como protoxinas estructuralmente estables y no tuvieron un efecto aparente en el plegamiento de la proteína o en el procesamiento proteolítico.

Teniendo esta información, se procedieron a realizar los bioensayos de toxicidad con las larvas de *Aedes aegypti*, probando únicamente estas 6 mutantes y la Cry4Ba silvestre.

10.9 Bioensayos a las larvas de *Aedes aegypti* de 4to. estadio

Para conocer los efectos en la toxicidad de las mutantes en las asas 2 y α -8, éstas se probaron como espora cristal en larvas de *Aedes aegypti* de 4to. estadio. El rango de concentraciones de las esporas cristal probadas estuvo entre 1 a 1500 ng/mL para la Cry4Ba silvestre y sus mutantes (tabla 8).

Toxina	LC ₅₀ (ng/mL)
Cry4Ba silvestre	79.42 (61.00 - 102.40)
α 8M1	117.20 (93.87 - 146.66)
α 8M2	148.25 (95.13 - 219.82)
L2M1	114.88 (81.64 - 160.39)
L2M2	173.18 (105.19 - 282.98)
L2M3	455.95 (355.29 - 596.64)
L2M4	767.57 (678.26 - 861.88)

Tabla 8. LC₅₀ de la toxina Cry4Ba silvestre y de sus mutantes L2M1, L2M2, L2M3, L2M4, α 8M1 y α 8M2.

Para la determinación de la LC₅₀ se utilizó el programa estadístico Probit. El análisis estadístico Probit es comúnmente usado en toxicología para determinar la toxicidad relativa de ciertas toxinas a los organismos vivos; en este caso, a las larvas del mosquito *Aedes aegypti*. El procedimiento es probar la respuesta de un organismo a diferentes concentraciones de toxina y, posteriormente, comparar estas dosis con la respuesta generada. La respuesta es siempre binomial (mata/no mata) y la relación entre dosis- respuesta es siempre una curva sigmoide.

Hay muchos criterios de valoración utilizados para comparar la toxicidad entre diferentes toxinas; el más empleado de ellos es la LC₅₀, la cual se refiere a la concentración de toxina en la que el 50% de la población muere.

El programa Probit nos indicó que los valores de chi-cuadrada (χ^2) obtenidos para cada muestra eran muy buenos para el ajuste de los datos.

Las mutantes que se vieron afectadas en toxicidad de manera más notoria fueron: L2M2, L2M3 y L2M4, todas ellas en el asa 2. La toxicidad de la mutante L2M2 se vio reducida en 2.2 veces, L2M3 se vio reducida en 5.7 veces y la de la mutante L2M4 en 9.6 veces, todas en comparación con la silvestre.

Con respecto a los valores de LC_{50} de las otras mutantes, a pesar de que fueron un poco mayores al de la silvestre, no se puede decir que estén realmente afectadas en toxicidad, ya que sus valores llegan a caer dentro del rango de Cry4Ba silvestre (números entre paréntesis a la izquierda del valor de LC_{50}).

10.10 Ensayo de unión de la toxina Cry4Ba y sus mutantes a las VMMA´s de *Aedes aegypti*

Se ha visto que en las VMMA de larvas de *Aedes aegypti* se encuentran proteínas que actúan como receptores de la toxinas Cry11Aa, Cry4Aa y Cry4Ba (Buzdin *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2010), por lo que el experimento de unión de las mutantes de Cry4Ba a las vesículas de este mosquito, nos permitió observar si la sustitución de aminoácidos realizada en cada una de las asas expuestas del dominio II (asa 2 y asa $\alpha 8$) llegó a afectar su interacción con alguna proteína que le sirva como receptor, como es el caso de fosfatasa alcalina, caderina o aminopeptidasa. En esta unión, se puede apreciar que todas las mutantes presentan una unión menor en comparación con la de la Cry4Ba silvestre a las VMMA (figura 28).

Debajo de cada banda de 48kDa (correspondiente al peso del fragmento de Cry4Ba resistente a tripsina) se observa un porcentaje que representa la unión de Cry4Ba y sus mutantes a las VMMA´s (calculado con el programa ImageJ). En este caso, la unión de la Cry4Ba silvestre a las vesículas representó el 100% y con base a ello, se obtuvieron los demás datos para sus mutantes.

Unión de Cry4Ba y sus mutantes a las VMMA

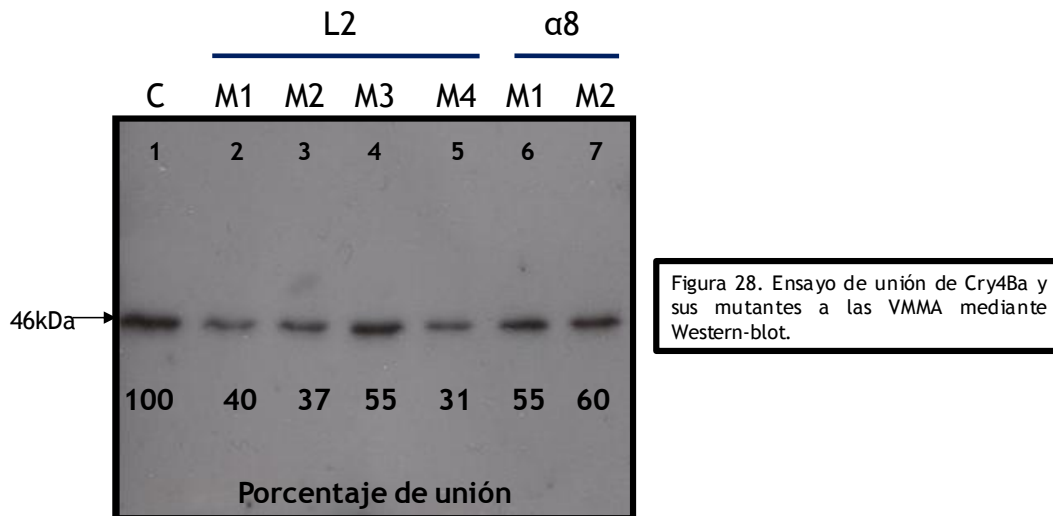


Figura 28. Ensayo de unión de Cry4Ba y sus mutantes a las VMMA mediante Western-blot.

Debajo de cada banda de 48kDa (correspondiente al peso del fragmento de Cry4Ba resistente a tripsina) se observa un porcentaje que representa la unión de Cry4Ba y sus mutantes a las VMMA's (calculado con el programa ImageJ). En este caso, la unión de la Cry4Ba silvestre a las vesículas representó el 100% y con base a ello, se obtuvieron los demás datos para sus mutantes. Pudiera decirse que la mutante más afectada corresponde a la L2M4, con una reducción en unión a las VMMA del 69% aproximadamente. Las asas que le siguen en afectación son L2M1, L2M2, $\alpha 8$ M1, L2M3 y $\alpha 8$ M2, con una disminución en unión del 60%, 63%, 45%, 45% y 40%, respectivamente.

10.11 Unión de Cry4Ba y sus mutantes a la ALP1 (ELISA y ensayo de unión a ligando)

Para analizar cuáles son las asas del dominio II de la toxina Cry4Ba importantes para la unión con sus moléculas receptoras se usaron herramientas como: "Far Western-blot" y pruebas de ELISA. La comparación de ambas técnicas nos dio la oportunidad de conocer qué mutantes estaban más afectadas a la unión de ALP1, caderina y Cyt1Aa.

En el caso de la unión Cry4Ba con la ALP1, ya habíamos obtenido un valor de concentración media de saturación de 232.4nM. Después, lo que decidimos hacer fue probar, en un ensayo de ELISA, la unión de Cry4Ba y sus mutantes a la ALP1. Los resultados de absorbancia a 490nm fueron representados como porcentaje de unión a la ALP1; es decir, el valor de unión Cry4Ba silvestre a la ALP1 se representó como

el 100% y con base a ello, se calculó el porcentaje de unión de las mutantes de Cry4Ba a la ALP1 (figura 29).

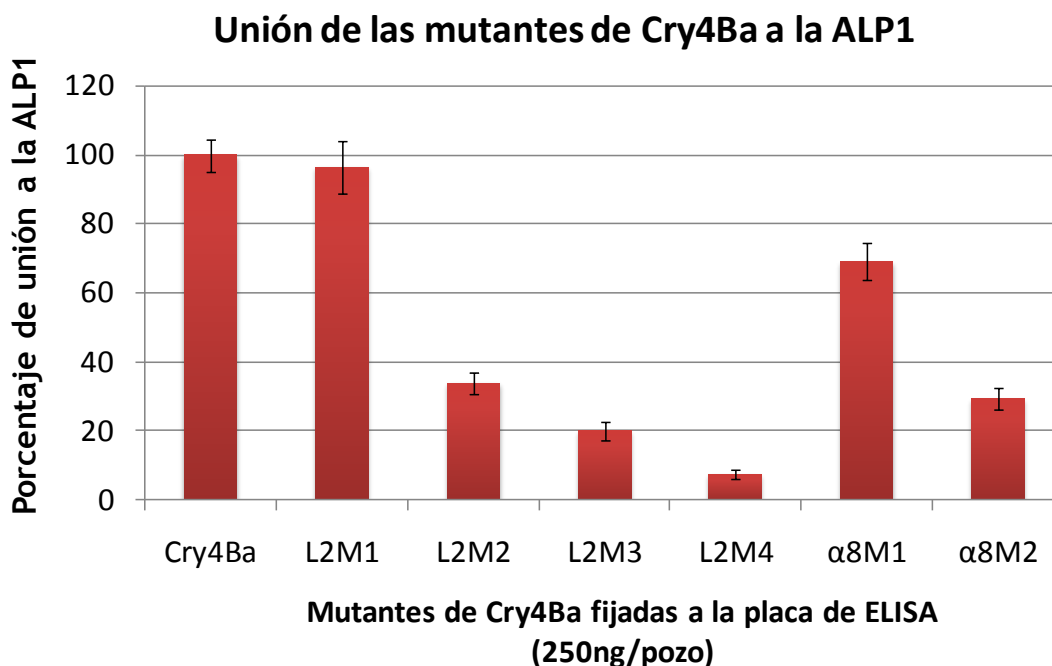
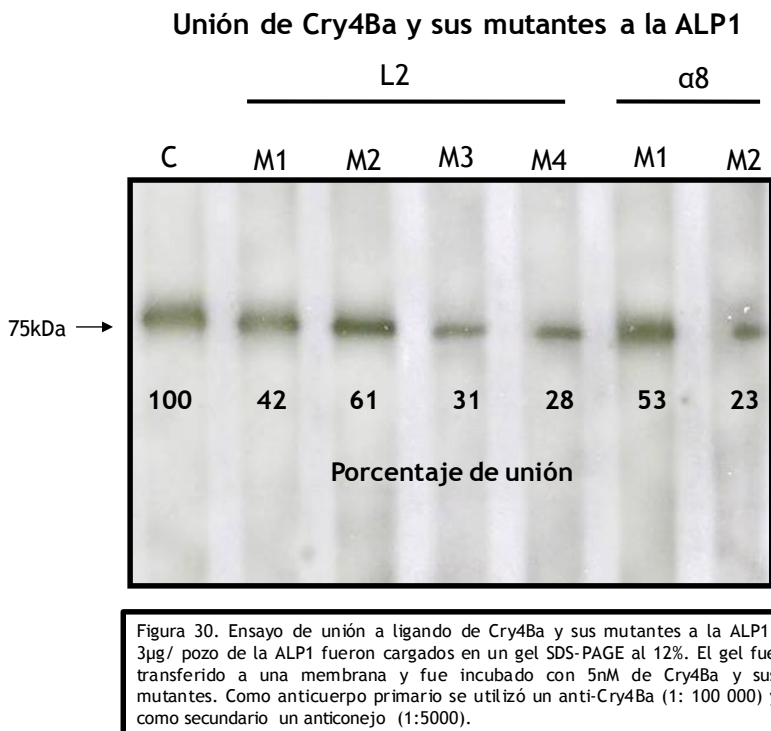


Figura 29. Ensayo de unión de Cry4Ba y sus mutantes a la ALP1 mediante prueba de ELISA. Se fijó 2.5ng/μL de Cry4Ba y sus mutantes a la placa de ELISA durante toda la noche a 4°C. La concentración de ALP1 utilizada fue de 50nM. Como anticuerpo se utilizó un anti-histidinas (QIAGEN) 1:5000.

Es importante mencionar que todas las mutantes, exceptuando la L2M1, estuvieron afectadas en unión a este receptor. Con respecto al asa 2, la mutante L2M4 fue la que redujo mayormente su unión a ALP1, aproximadamente en un 90%. Para el asa α-8, la α8M2 fue la que mostró menor unión (30%); valor muy similar al presentado por la mutante L2M2.

En el caso del “Far Western-blot” se observan resultados similares a este ELISA (Fig. 30). Las mutantes que se ven más afectadas en unión con la ALP1 son: L2M3, L2M4 y α8M2; con una disminución del 69, 72 y 77% en la unión, respectivamente.

Con los datos obtenidos hasta aquí, se decidió seguir explorando las uniones de estas mutantes a los fragmentos de caderina de *Aedes aegypti* y a la Cyt1Aa. Esto nos ayudará a conocer si estas regiones en las asas del dominio II de la Cry4Ba son solamente importantes para la unión a la ALP1 o si también pudieran ser relevantes para su interacción con sus otras moléculas receptoras.



10.12 Unión de Cry4Ba a los fragmentos de caderina G7, C13 y G10 de *Aedes aegypti*

En el modelo del mecanismo de acción planteado para lepidópteros (Bravo *et al.* 2004) se ha visto que la caderina actúa como una molécula clave (primer receptor) para la unión de las toxinas Cry específicas para estos insectos. Con base a esto, lo que pretendimos realizar en este experimento fue probar la unión de 3 fragmentos de caderina de *Aedes aegypti*: G7, C13 y G10 a la toxina Cry4Ba (Fig. 31). La descripción de cada fragmento se muestra en la tabla 9.

De estos tres fragmentos, ya se había reportado que uno de ellos (G10) unía a la toxina Cry11Aa en ensayo de unión a ligando (Chen *et al.*, 2009); por lo que queremos analizar si esto también se cumple para el caso de la toxina Cry4Ba, ya que ambas toxinas presentan especificidad para el díptero *Aedes aegypti*. En la figura 31, se puede ver representada la distribución de estos fragmentos de caderina en *Aedes aegypti*; siendo el fragmento G10 (parte del CR7 y CR8-11) el sitio de unión de la toxina Cry11Aa.

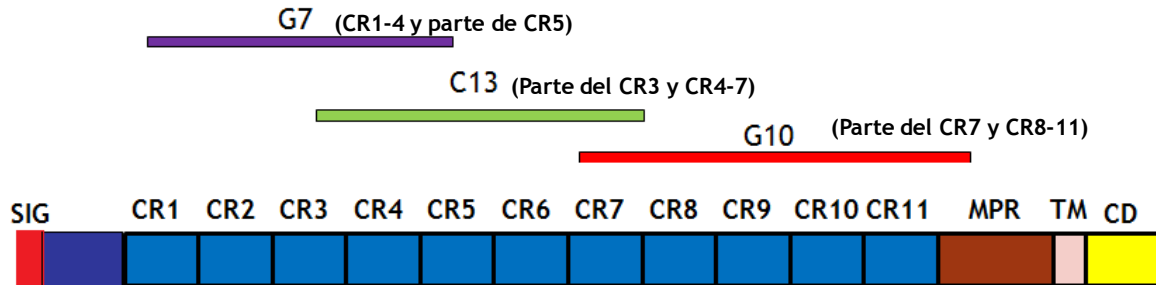


Figura 31. Representación esquemática de la caderina de *Aedes aegypti*. CR, repetido de caderina; SIG, péptido señal; MPR, región proximal a la membrana; TM, dominio transmembranal; CD, dominio citoplasmático. Tomado de Chen, *et al.*, 2009.

Nombre	Secuencia	Peso molecular (kDa)	Descripción
G7	ITLVEGD-- --- EAYETLFL	68.5	Secuencia de aminoácidos de 121-726 de caderina, contiene CR1-4 y parte de CR5
C13	GTFTLTIV-- ---- NELDRDT	57.4	Secuencia de aminoácidos de 440-952 de caderina, contiene parte de CR3 y CR4-7
G10	KTFPDLQK ----- DFIGIDND	87.7	Secuencia de aminoácidos de 911-1696 de caderina, contiene parte de CR7 y CR8-11

Tabla 9. Descripción de los fragmentos G7, C13 y G10 de caderina de *Aedes aegypti* (Chen *et al.*, 2009).

Con base a esto, se decidió realizar un experimento de unión de la toxina Cry4Ba silvestre a cada uno de estos fragmentos de caderina; los cuales fueron purificados por afinidad en una columna níquel-agarosa, como en el caso de la ALP1. Su expresión y purificación se observa en la figura 20.

Posteriormente, se realizó un ensayo de ELISA para ver la unión de cada uno de estos fragmentos de caderina a la Cry4Ba; el experimento fue hecho por triplicado.

En la placa de ELISA se fijaron 250 ng/pozo de cada uno de los fragmentos, y la unión se probó con 125nM de toxina Cry4Ba. Como control negativo se utilizó el pozo bloqueado con leche al 2% en PBS-tween al 0.1%, incubado con la toxina Cry4Ba y los anticuerpos correspondientes indicados en

materiales y métodos. En otras palabras, los pozos no fueron pre-incubados con los fragmentos de caderina.

A los valores de absorbancia obtenidos para la unión de cada fragmento de caderina a Cry4Ba, se les restó el valor de absorbancia generado por el control negativo. Los resultados obtenidos para cada fragmento fueron promediados y se les calculó su desviación estándar (Fig. 32).

Los resultados de este experimento señalan una unión más afín del fragmento G10 por la Cry4Ba, comparada con la de los otros dos. Esto indica que Cry4Ba une preferentemente a la secuencia de aminoácidos de 911-1696 de caderina, que contiene parte del CR7 y CR8-11.

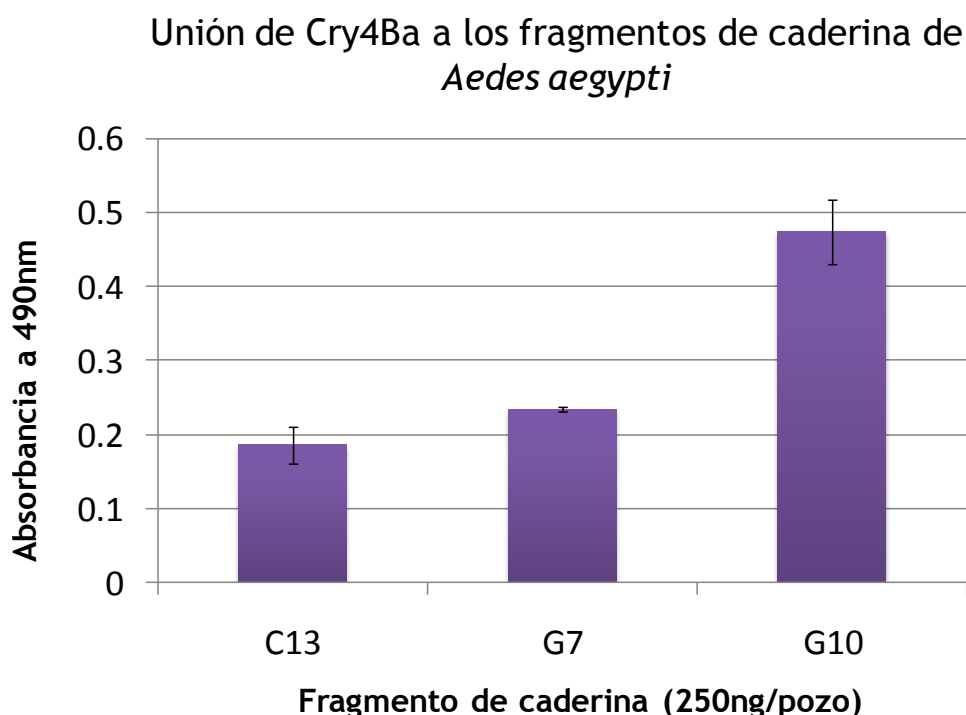


Figura 32. Análisis de la unión de Cry4Ba con los fragmentos de caderina de *Aedes aegypti* (Chen *et al.*, 2009) mediante prueba de ELISA. A la placa se fijaron 250ng/pozo de cada uno de los fragmentos y después fueron incubados con 125nM de la toxina Cry4Ba. La unión fue revelada con el anticuerpo primario antiCry4Ba (1: 10 000) y con el anticuerpo secundario anti-conejo (1: 10 000) durante 1h cada uno de ellos.

10.13 Unión de Cry4Ba y sus mutantes al fragmento G10 de caderina

Sabiendo que el fragmento G10 de caderina une a la toxina Cry4Ba, se procedió a realizar una curva de saturación de dicha unión.

La concentración media de saturación obtenida fue de 116.8nM y el ajuste de línea recta proporcionó una R^2 de 0.9923, lo que significó que nuestros datos fueron confiables (Fig. 33).

Con esta información, se realizó el ensayo de unión de Cry4Ba y sus mutantes a este fragmento. El experimento también se realizó mediante prueba de ELISA (Fig. 34).

Curva de saturación de la unión Cry4Ba-fragmento G10 de caderina de *Aedes aegypti*

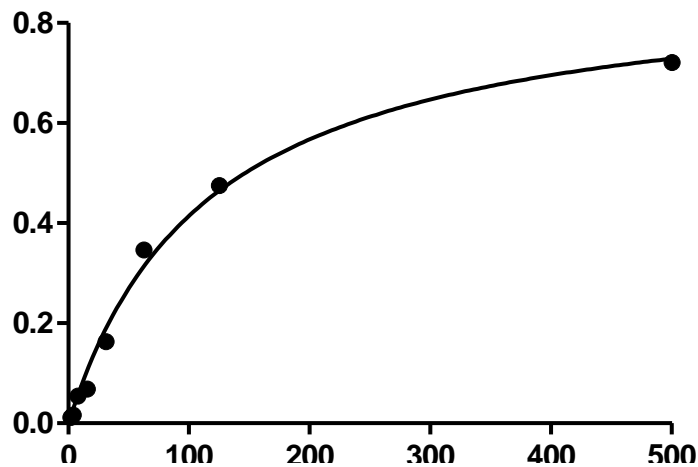


Figura 33. Curva de saturación de la unión Cry4Ba-fragmento G10 de la caderina mediante la prueba de ELISA. 2.5ng/ μ L del fragmento G10 por pozo fueron fijados a la placa durante toda la noche a 4°C. Las concentraciones de Cry4Ba utilizadas fueron desde 1000nM a 1.96nM (utilizando diluciones dobles seriadas). El anticuerpo primario utilizado fue antiCry4Ba (1:10 000) y como secundario anti-conejo (1:10 000).

De manera muy similar a los datos obtenidos para la unión a la ALP1, las mutantes que muestran menor porcentaje de unión a este fragmento son: L2M2, L2M3, L2M4 y α 8M2. Siendo la mutante L2M4 la más afectada en unión, con una reducción del 90% en comparación con la silvestre.

Todos estos valores podrían ser indicio de que ambas asas del dominio II, asa 2 y asa α 8, son importantes para la unión a sus moléculas receptoras: ALP1 y caderina.

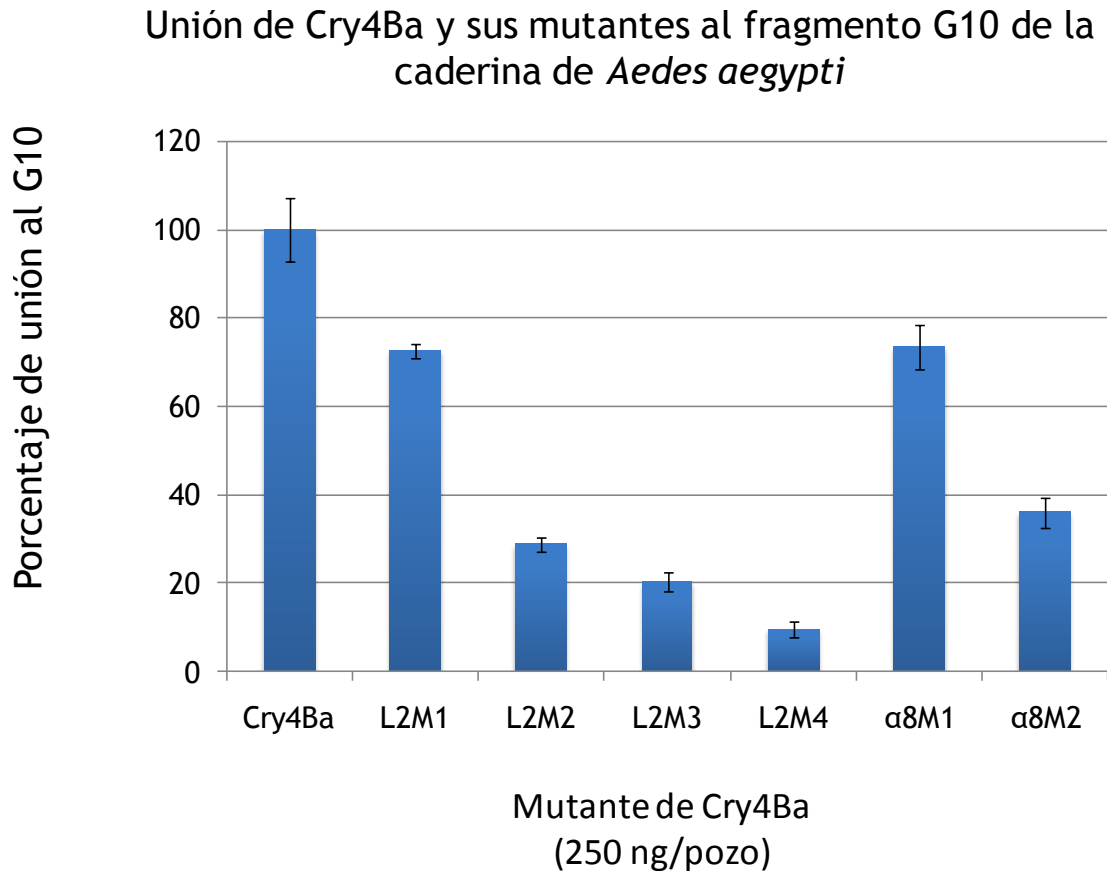


Figura 34. Ensayo de unión de Cry4Ba y sus mutantes al fragmento G10 de caderina mediante prueba de ELISA. Se fijó 2.5ng/ μ L de Cry4Ba y sus mutantes a la placa de ELISA durante toda la noche. La concentración de G10 usada fue 100nM. El anticuerpo utilizado fue un anti-his peroxidado (1:5000).

10.14 Unión de la Cry4Ba a la Cyt1Aa

De la misma manera en que se construyó la curva de unión de la Cry4Ba a la ALP1 y a cada uno de los fragmentos de caderina, también fue necesario construir una curva de saturación de la unión de la Cry4Ba y la Cyt1Aa. A partir esta curva, obtuvimos el valor medio de saturación de la unión y con esta concentración, se analizó si alguna de las mutantes de Cry4Ba construidas estaba afectada en unión a este receptor.

La concentración media de saturación obtenida fue de 46.94nM y el ajuste de línea recta proporcionó una R^2 de 0.9232, lo que significó que nuestros datos fueron confiables.

Curva de saturación de la unión Cry4Ba a la Cyt1Aa

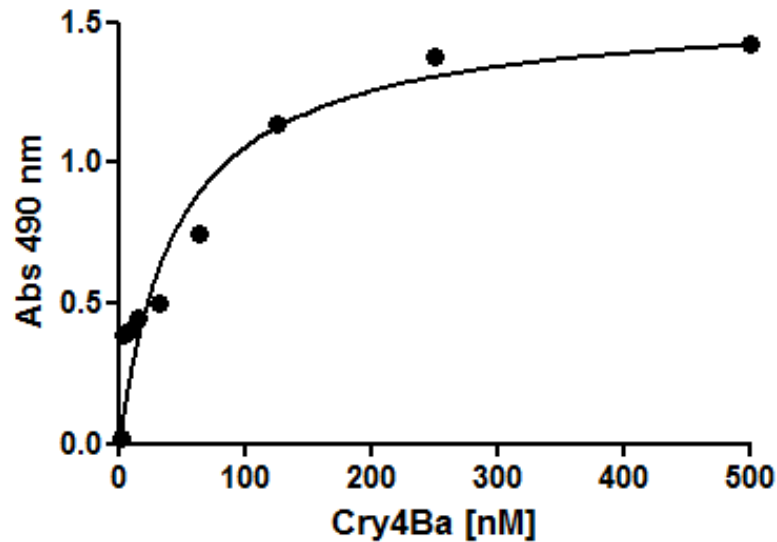


Figura 35. Curva de saturación de la unión Cry4Ba-Cyt1Aa mediante la prueba de ELISA. 2.5ng/ μ L de Cyt1Aa por pozo fueron fijados a la placa durante toda la noche a 4°C. Las concentraciones de Cry4Ba utilizadas fueron desde 1000nM a 1.96nM (utilizando diluciones dobles seriadas). El anticuerpo primario utilizado fue antiCry4Ba (1:10 000) y como secundario anti-conejo (1:10 000).

10.15 Unión de la Cry4Ba y sus mutantes a la Cyt1Aa (ELISA)

En un ensayo de ELISA también se probó la unión de las mutantes de Cry4Ba a Cyt1Aa. Con el resultado anterior de la curva de saturación de unión, se decidió probar una concentración de 75nM de las mutantes de Cry4Ba. En el ELISA de la figura 31 se puede ver que 4 son las mutantes que se afectan en unión, 2 en el asa 2 y 2 en el asa α 8 (L2M3, L2M4, α 8M1 y α 8M2).

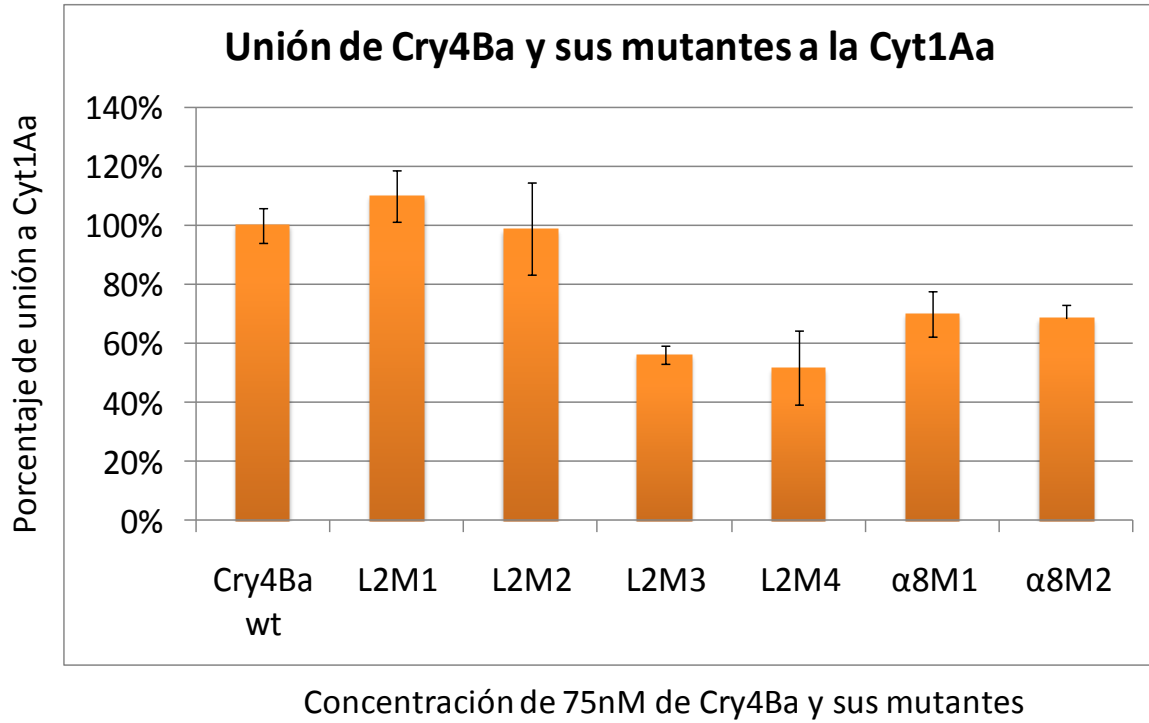


Figura 36. Ensayo de unión de Cry4Ba y sus mutantes a la Cyt1Aa mediante prueba de ELISA. Se fijó 2.5ng/μL de Cyt1Aa a la placa de ELISA durante toda la noche. Las concentraciones utilizadas de Cry4Ba y sus mutantes fueron de 75nM. Los anticuerpos utilizados fueron: antiCry4Ba (1:10 000) y anticonejo (1:10 000).

11. DISCUSIÓN

En el presente estudio, inicialmente se exploraron las regiones de las asas correspondientes a la superficie expuesta del dominio II de la toxina Cry4Ba de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*), la cual presenta una fuerte toxicidad contra el mosquito *Aedes aegypti*. La idea de este proyecto, era la de conocer las regiones de estas asas que pudiesen estar involucradas en unión a sus moléculas receptoras en dicho insecto. En trabajo previo, ya se habían reportado algunas moléculas que podían actuar como receptoras de las toxinas Cry contra dípteros; tales como: fosfatasa alcalina (Buzdin *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2009; Bayyareddy *et al.*, 2009) y caderina (Hua *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009). Además, también se ha visto que la toxina Cyt1Aa, producida por *Bti*, sinergiza el efecto tóxico de Cry11Aa funcionando como un receptor unido a membrana en *Aedes aegypti* (Pérez *et al.*, 2005).

Bajo esta premisa, las asas de Cry4Ba tomadas a consideración en este trabajo fueron: el asa $\alpha 8$, asa 1, asa 2 y asa 3. En un principio, se construyeron péptidos sintéticos correspondientes a estas regiones: asa 1 (327 WTNTIYQDLRFL 338), asa 2 (383 ITDTSSPSNRVTKM 396), asa 3 (446 SYIKTDVIDYNSNR 459) y el asa α -8 (300 SSKSIAALE 308); los cuales fueron probados en un ensayo de competencia por la unión Cry4Ba-ALP1 (Fig. 23). Con la utilización de dos concentraciones molares en exceso de estos péptidos sintéticos (1:250 y 1:500) con respecto a la concentración inicial de ALP1, se observó que el asa correspondiente al $\alpha 8$ compitió muy bien dicha unión cuando se probó en un exceso de 1:500. Este dato coincidió con el reportado para la toxina Cry11Aa, también específica para dípteros, donde se vio que el asa α -8 del dominio II es un epítipo importante para la interacción con su receptor fosfatasa alcalina en *Aedes aegypti* (Fernández *et al.*, 2006). Ahora bien, tomando como base este resultado, se optó por generar mutantes en esta asa y también en el asa 2, a pesar de que esta última no compitió por la unión Cry4Ba-ALP1 en ninguno de los dos excesos. La selección del asa 2 se justificó porque en la mayoría de los reportes le conceden un papel importante en la toxicidad de Cry4Ba contra *Aedes* (Abdullah *et al.*, 2003 y Tofazzal *et al.*, 2009). Cabe señalar, que el hecho de que el asa 2 no haya competido la unión entre Cry4Ba y la fosfatasa alcalina, mediante “Far Western-blot”, no significa que

no tenga un papel importante en la interacción con ALP1; ya que en este tipo de experimentos, la conformación que adoptan los péptidos sintéticos en solución pudiese variar. Esto depende en gran medida de la polaridad del ambiente, el número de aminoácidos presentes en el péptido y si están o no cargados.

Teniendo en consideración lo mencionado, las mutantes de ambas asas fueron generadas realizando un “scanning” de alanina mediante mutagénesis dirigida al sitio; de tal manera que se construyeron 7: 4 en el asa 2 y 3 en el asa α -8. Las mutantes en el asa 2 fueron denominadas: **L2M1** (383 AAATSSPSNRVTKM 396), **L2M2** (383 ITDAAAPSNRVTKM 396), **L2M3** (383 ITDTSSAAARVTKM 396) y **L2M4** (383 ITDTSSPSNAAAAM 396); para el asa α -8: **α 8M1** (300 AAASIAALE 308), **α 8M2** (300 SSKAAAAL 308) y **α 8M3** (300 SSKSIAAAA 308) (Fig. 24).

Todos los plásmidos con el gen de Cry4Ba con la mutación deseada, fueron exitosamente introducidos en la cepa acristalífera de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* serotipo 1-407 (Fig. 25). Posteriormente, a cada una de las toxinas mutantes se les analizó su grado de solubilización y activación (Fig. 26 y 27). De las 7 mutantes probadas, solamente una de ellas, correspondiente al asa α -8 (**α 8M3**), presentó una disminución en la solubilización con el amortiguador de carbonatos y por ende, también en su activación. Esto nos habla de que las mutaciones realizadas en esta región pudieron haber afectado de alguna manera el plegamiento de esta proteína y además, haberla hecho más sensible al procesamiento con tripsina; no así para las 6 mutantes restantes, las cuales generaron dos fragmentos activos de 48 kDa y 16 kDa similares a los de la silvestre.

Para apreciar los efectos de las mutaciones en Cry4Ba, cada una de las esporas-cristal de *Bt* (excepto la **α -8M3**) fueron probadas en bioensayos de toxicidad contra las larvas de *Aedes aegypti* de 4to estadio (tabla 8). Los resultados muestran que las principales mutantes afectadas fueron las correspondientes al asa 2: **L2M2**, **L2M3** y **L2M4**, las cuales disminuyeron su toxicidad comparada con la silvestre en 2.2, 5.7 y 9.6 veces, respectivamente. Estos datos coinciden con los reportados por Abdullah *et al.*, en el 2003; en los cuales se generó una mutante en el asa 2 del dominio II de la toxina Cry4Ba (NDY, se insertó entre V393 y T394) en la que se abatió la toxicidad contra *Aedes aegypti*. De manera similar, se había visto que una mutante en el asa 2, P389A, redujo su actividad larvicida en el mismo mosquito en un 65% (Tuntitippawan, *et al.*, 2004). Se han reportado observaciones similares en donde el asa 2 del

dominio II de Cry4Aa es esencial para mantener la toxicidad contra la larva de *C. pipiens* (Tofazzal *et al.*, 2009).

Cabe destacar que otro dato curioso en el bioensayo realizado, fue que la mutante $\alpha 8M2$ (300 SSKAAAAL 308) también se vio ligeramente afectada en su toxicidad (1.8 veces menor que la silvestre). Esto quizá podría sugerir, que la disminución en toxicidad de esta mutante es consecuencia de una pérdida en la unión de Cry4Ba al receptor fosfatasa alcalina (ensayo de competencia con los péptidos sintéticos); sin embargo, fue necesario realizar otros experimentos de unión de estas mutantes a las VMMA de *A. aegypti*, a la ALP1 y a la caderina para obtener una panorámica más amplia.

Cuando las mutantes fueron analizadas en su unión a las VMMA, nuevamente se observó que la mutante más afectada correspondió a la L2M4, con una reducción en la unión del 69%; después le siguió la mutante L2M2, L2M1, $\alpha 8M1$ y $\alpha 8M2$, con una disminución del 63%, 60%, 45%, 45% y 40%, respectivamente (Fig. 28). En este experimento no se analizó la unión a una proteína en particular de las VMMA, por lo que no se puede hablar específicamente de una disminución en la interacción de las mutantes a caderina o a fosfatasa alcalina, pero sí se puede decir que es una disminución en unión a las proteínas que funcionan como receptores de esta toxina. Por lo que fue importante realizar ensayos de ELISA probando la unión de estas mutantes a caderina y a ALP1.

Con respecto a los ensayos de unión a la ALP1 (ELISA y “Far Western-blot”) es de notar que casi todas las mutantes estuvieron afectadas, con excepción de la L2M1. La reducción más notable fue observada para las mutantes L2M3, L2M4 y $\alpha 8M2$. Este dato fue muy interesante, debido a que correlaciona muy bien con lo obtenido en el bioensayo de toxicidad a las larvas de *A. aegypti* y con el ensayo de competencia de los péptidos sintéticos (para el asa $\alpha 8$) y con el ensayo de unión a las VMMA. Esto significaría que el asa 2 y el asa $\alpha 8$ juegan un rol importante en la unión de Cry4Ba a su receptor fosfatasa alcalina; más concretamente los aminoácidos comprendidos en la región **392 RVTK 395** (mutados en L2M4) y **303 SI 304** (mutados en $\alpha 8M2$).

Siguiendo con las uniones a moléculas receptoras, primero se hizo un experimento de ELISA para probar la unión de tres fragmentos de caderina de *Aedes aegypti*: G7, C13 y G10 a la toxina Cry4Ba (Chen *et al.*, 2009). El resultado reveló que el fragmento G10, correspondiente con la secuencia de aminoácidos 911 a 1696 (parte de CR7 y CR8-11), unió con mayor afinidad a la Cry4Ba en comparación con los otros

dos fragmentos (Fig. 31 y 32). Este resultado coincidió con el reportado para la toxina Cry11Aa (Chen *et al.*, 2009); en el cuál, Cry11Aa une a esta misma región de caderina (fragmento G10) pero con mayor afinidad que la Cry4Ba ($Kd_{Cry11Aa - G10}$: 16.7 nM vs. $Kd_{Cry4Ba - G10}$: 116.8nM) (Fig. 33). De cierta manera, las diferencias en afinidades de Cry11Aa y Cry4Ba por la caderina podría explicar el hecho de que Cry11Aa sea más tóxica que Cry4Ba contra *A. aegypti*.

Ahora bien, cuando se probó la unión de este fragmento G10 a la Cry4Ba y sus mutantes, mediante la prueba de ELISA, se vio que L2M4, L2M3, L2M2 y en menor medida $\alpha 8M2$, disminuyeron su unión a G10 de manera importante; dato que también coincide con el bioensayo de toxicidad, la unión a VMMA y a ALP1.

Con estos elementos podemos decir que la mutante más afectada en la unión a estos dos receptores es L2M4; en otras palabras que la región **392 RVTK 395** del dominio II de Cry4Ba es importante para su unión con caderina y fosfatasa alcalina.

El siguiente cuestionamiento que surgió al obtener estos datos fue si las mutantes del dominio II de Cry4Ba, afectadas en unión a fosfatasa alcalina y caderina, también podrían estar afectadas en unión a Cyt1Aa. En el experimento de unión por ELISA de Cry4Ba-Cyt1Aa, se observó que 4 son las mutantes afectadas: L2M3, L2M4, $\alpha 8M1$ y $\alpha 8M2$ (**389 PSNRVTK 395** y **300 SSKSI 304**) (Fig. 36); lo cual coincide con las mismas mutantes afectadas en unión a sus otros dos receptores y con el reporte de Pérez en el 2005, donde se observó que la toxina Cry11Aa une a Cyt1Aa a través del asa $\alpha 8$.

Finalmente, cuando se analizan los valores de Kd de la unión de la toxina Cry4Ba silvestre a caderina, fosfatasa alcalina y Cyt1Aa (116.8 nM, 232. 4 nM y 46.94 nM, respectivamente), se puede decir que Cry4Ba no es tan afín a la región de CR7-CR11 de caderina de *A. aegypti*, como lo reportado para Cry11Aa (Chen *et al.*, 200) u otras toxinas Cry para lepidópteros (Bravo *et al.*, 2004). Para la fosfatasa alcalina, Cry4Ba presenta una afinidad baja; lo cual podría esperarse, ya que se está analizando la unión de la toxina monomérica, siendo que en el mecanismo de acción propuesto (Bravo, *et al.*, 2004) la unión de la toxina Cry a la proteína anclada por GPI (fosfatasa alcalina) es en su forma oligomérica. Para Cyt1Aa, por su mayor afinidad a Cry4Ba en comparación con la fosfatasa alcalina, probablemente esté desempeñando la función del receptor caderina; lo cual coincidiría con el reporte en el que se muestra que Cyt1Aa sinergiza a Cry11Aa al inducir su oligomerización (Muñoz *et al.*, 2009).

Estos resultados nos pueden ayudar a entender mejor cómo es que las toxinas Cry contra dípteros matan a sus insectos blanco. Además, sabiendo la importancia de las asas del dominio II de Cry4Ba, podría considerarse que su modificación podría ser la mejor estrategia para generar toxinas con mayor actividad y con una especificidad más diversa.

12. CONCLUSIONES

→Se lograron obtener las 7 mutantes de Cry4Ba planeadas en el presente trabajo. 4 mutantes del asa 2 (L2M1, L2M2, L2M3 y L2M4) y 3 mutantes en el asa $\alpha 8$ ($\alpha 8M1$, $\alpha 8M2$ y $\alpha 8M1$). Solamente 6 solubilizaron y activaron de manera similar a la Cry4Ba silvestre: L2M1, L2M2, L2M3, L2M4, $\alpha 8M1$ y $\alpha 8M2$.

→En los bioensayos de toxicidad realizados a larvas de *Aedes aegypti* de 4to. Instar, las mutantes que redujeron su actividad fueron: L2M4 (9.6 veces), L2M3 (5.7 veces), L2M2 (2.2 veces) y $\alpha 8M2$ (1.87 veces).

→La mutante **L2M4 fue la más afectada** en la interacción con sus proteínas receptoras: fosfatasa alcalina y caderina (CR7-11); lo que sugiere que los aminoácidos comprendidos en la región **392 RVTK 395** desempeñan un papel crucial en la toxicidad de Cry4Ba. Así mismo, los aminoácidos **388 TSSPSN 391** y **303 SI 304** tienen un rol importante en estos eventos de unión.

→Los aminoácidos **300 SSKSI 304** (asa $\alpha 8$) y **389 PSNRVTK 395** (asa 2), parecen ser una pieza clave en la interacción de Cry4Ba con Cyt1Aa.

→La Kd de la unión de Cry4Ba silvestre al fragmento G10 de la caderina de *Aedes aegypti* (parte de CR7 y CR8-11) fue 7 veces más baja en comparación con la de la toxina Cry11Aa (Kd_{Cry11Aa - G10}: 16.7 nM vs. Kd_{Cry4Ba - G10}: 116.8nM), lo que podría correlacionar con las diferencias en toxicidad entre Cry11Aa y Cry4Ba en *A. aegypti*.

→Las diferencias en afinidad entre las uniones de Cry4Ba silvestre a Cyt1Aa y a ALP1 (Kd=46.94 nM y Kd=232.4 nM, respectivamente) sugieren que la Cyt1Aa, al tener mayor afinidad por la forma monomérica de Cry4Ba, podría estar actuando como el receptor caderina.

13. PERSPECTIVAS

→Obtener los valores de Kd para la interacción de la mutante L2M4 de Cry4Ba con la caderina y la ALP1.

→Realizar ensayos de sinergismo y obtener el factor de sinergismo de las mutantes L2M2, L2M3, α 8M1 y α 8M2 del dominio II de Cry4Ba con la Cyt1Aa.

→Realizar mutaciones puntuales de cada aminoácido del asa 2 del dominio II de Cry4Ba en la región comprendida de 392 RVTK 395. Posteriormente, realizar ensayos de unión a fosfatasa alcalina, caderina y Cyt1Aa.

→Analizar la unión del oligómero de Cry4Ba y las mutantes: L2M4 y α 8M2 a la ALP1.

→Caracterizar la unión de la toxina Cry4Aa a caderina y fosfatasa alcalina de igual forma que se hizo para la toxina Cry4Ba.

14. BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, M., Alzate, O., Mohammad, M., McNall, R., Adang, M., Dean D. (2003). Introduction of *Culex* Toxicity into *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba by Protein Engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5343-5353.
- Abdullah, M.A.F., Dean, D.H. (2004). Enhancement of Cry19Aa Mosquitocidal Activity against *Aedes aegypti* by Mutations in the Putative Loop Regions of Domain II. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:3769-3771.
- Abdullah, M.A.F., Valaitis A.P., Dean D.H. (2006). Identification of *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba Toxin Binding Aminopeptidase from Mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry.* **7**: 16
- Angst, B.D., C. Marcozzi, A. I. Magee. (2001). The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J. Cell Sci.* **114**:629-641
- Angsuthanasombat, C., Crickmore, N., Ellar, D.J. (1992). Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism *in vivo*. *FEMS Microbiol. Lett.* **73**: 63-68.
- Angsuthanasombat, C., Crickmore, N., Ellar, D.J. (1993). Effects on toxicity of eliminating a cleavage site in a predicted interhelical loop in *Bacillus thuringiensis* CryIVB delta-endotoxin. *FEMS Microbiol. Lett.* **111**:255-261.
- Armstrong, J.L., Rohrmann, G.F., Beaudreau, G.S. (1985). Delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. *J. Bacteriol.* **161**: 39-46.
- Bai, D., S.C.R., Lummis, W. Leicht, H. Breer, D. B. Sattelle. (1991). Actions of imidacloprid and a related nitromethylene cholinergic receptors of an insect motor neurone. *Pestic. Sci.* **33**: 197-204.
- Black, B. C., R. M. Hollingsworth, K. I. Ahammadsahib, C. D. Kukel, S. Donovan. (1994). Insecticidal action and mitochondrial uncoupling activity of AC-303,630 and related halogenated pyrroles. *Pestic. Biochem. Physiol.* **50**: 115-128.
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D.J., Li, J. (2005). Crystal Structure of the Mosquitocidal-Toxin Cry4Ba and Its Biological Implications. *J. Mol. Biol.* **384**: 363-382.

- Bourne, Y., V. Zamboni, A. Barre, W.J. Peumans, E.J. Van Damme, P. Rougé. (1999). *Helianthus tuberosus* lectin reveals a widespread scaffold for mannose-binding lectins. *Structure* **7**:1473-1482.
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S.S., Soberón M. (2004). Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *BB Acta.* **1667**: 38-46.
- Chen, J., Brown, M.R., Hua, G. Adang, M.J. (2005). Comparison of the localization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A delta endotoxins and their binding proteins in larval midgut of tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res.* **321**: 123-129.
- Chen, J., Aimanova, K.G., Fernández, L.E., Bravo, A., Soberón, M. Gill, S.S. (2009). *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biochem. J.* **424**: 191-200.
- Cheong H., Gill S.S (2003). Cloning and Characterization of a Cytolytic and Mosquitocidal δ -Endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3254-3260.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feiltelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Dean, D.H. (1998). Revision of Nomenclature of *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol.Mol. Biol. Rev.* **62 (3)**: 807-813.
- Dai, S.-M., Gill, S.S.. (1993). *In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **23**:273-283.
- de Maagd, R.A., P.L. Bakker, L. Masson, M. J. Adang, S. Sangadala, W. Stiekema, D. Bosch. (1999). Domain III of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Cry1Ac is involved in binding to *Manduca sexta* brush border membranes and to its purified aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* **31**:463-471.
- de Maagd, RA., Weemen-Hendricks, M. Stiekema, W. Bosch, D. (2000). *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1559-1563.
- de Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect World. *Trends in Genetics.* **17**:193-199.

- Du, C., P.A.W. Martin, K.W. Nickerson. (1994). Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. Appl. Environ. Microbiol. **60**:3847-3853.
- Elbert, A., H. Overbeck, K. Iwaya, S. Tsuboi. (1990). Imidacloprid, a novel systematic nitromethylene insecticide for crop protection. Brighton Crop Prot. Conf. **1**: 21-28.
- Fernández, L.E., Pérez, C., Segovia, L., Rodríguez, M.H., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M. (2005). Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop α -8 of domain II. FEBS Lett, **579**: 3508-3514.
- Fernández, L.E., Aimanova, K.G., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M. (2006). A GPI anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry 11Aa in *Aedes aegypti* larvae. Biochem. J. **393**: 1-8.
- Fernández, L.E., Martínez, C., Lira, E., Chen, J., Evans, A., Hernández, S., Lanz H., Bravo, A., Gill, S. Soberón, M. (2009). Cloning and Epitope Mapping of Cry11Aa-Binding Sites in the Cry11Aa-Receptor Alkaline Phosphatase from *Aedes aegypti*. Biochemistry **48**: 8899-8907.
- Flanagan, R.D., Yu, C. G., Mathis, J.P., Meyer, T. E., Shi, X., Siqueira, H.A., Siegfried, B.D. (2005). Identification, cloning and expression of a Cry1Ab cadherin receptor from European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera, Crambidae). Insect Biochem. Mol. Biol. **35**: 33-40
- Gahanm, L. J., Gould, F., Heckel, D.G. (2001). Identification of a gene associated with *Bacillus thuringiensis* resistance in *Heliothis virescens*. Science. **293**: 857-860.
- Gill, S.S., Singh, G.J., Hornung, J.M. (1987). Cell membrane interaction of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* cytolytic toxins. Infect. Immun. **55**: 1300-1308.
- Gill, S.S., E.A. Cowles, V. Francis. (1995). Identification, isolation and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAC toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. J. Biol. Chem. **270**: 27277-27282.
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., Soberón, M. (2002). Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. FEBS Letters. **513**:242-246.

→Griffitts, J.S., S.M. Haslam, T. Yang, S.F. Garczynski, B. Mulloy, H. Morris, P.S. Cremer, A. Dell, M.J. Adang, R.V. Aroian. (2005). Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science* **307**:922-925.

→Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Puzsai-Carey, J.L. Sachwartz, R. Brousseau, and M. Cygler. (1995). *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* **254**:447-464.

→ Gubler, D. J. (1989). *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **40**: 571-578.

→Gubler D.J. (1998). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews.* **11(3)**: 480-496.

→Gubler, D. J. (2002). Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* **10**: 100-103.

→Guillet, P., Kurstack, D.C., Philippon, B., Meyer, R. (1990). *Bacterial control of Mosquitoes and Blackflies*, eds. De Barjac H and Sutherland D.J. (Rutgers Univ. Press, Piscataway, NJ), pp. 187-190.

→Gumbiner, B.M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**:345-357.

→Hollingshaus, J. G., and R. J. Little, Jr. (1984). Comparative toxicology of AC 217,300 in various species of insects. *Pestic. Biochem. Physiol.* **22**: 337-345.

→Hossain, D.M., Y. Shitomi, K. Moriyama, M. Higuchi, T. Hayakawa, T. Mitsui, R. Sato, H. Hori. (2004). Characterization of a novel plasma protein membrane, expressed in the midgut epithelia of *Bombyx mori*, that binds to Cry1A toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4604-4612.

→Jurat-Fuentes, J.L., M.J. Adang. (2004). Characterization of a Cry1Ac receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J. Biochem.* **271**: 3127-3135.

→Jurat-Fuentes, J.L., A.P., Valaitis, M. J. Adang. (2005). Abstr. 38th Annu. Meet. Soc. Invertebr. Pathol., abstr. 17.

- Jurat-Fuentes, J.L., M.J. Adang. (2006). Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **92**:166-171.
- Knight, P.J., N. Crickmore, D.J. Ellar. (1994). The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A (c) δ -endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* **11**:429-436.
- Komano, T., Yamigawa, M., Nishimoto, T., Yoshisue, H., Tanabe, K., Sen, K., Sakai, H., (1998). Activation process of the insecticidal proteins CryIVA and CryIVB produced by *Bacillus thuringiensis* subs *israelensis*. *Isr. J. Entomol.* **32**: 185-198.
- Koni, P.A., Ellar, D.J. (1994). Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic δ -endotoxins. *Microbiol* **140**: 1869-1880.
- Koppenhöfer, A.M, Wilson, M., Brown, I., Kanya, H.K., Gaugler, R. (2000). Biological control agents for white grubs (Coleoptera: scarabaeidae) in anticipation of an establishment of the Japanese beetle in California *J. Econ Entomol.* **93**(1): 71-80.
- Lee, X., A. Thompson, Z. Zhang, H. Ton-that, J. Biesterfeldt, C. Ogata, L.. Xu, R.A. Johnston, and N.M. Young. (1998). Structure of the Complex of *Maclura pomifera* Agglutinin and the T-antigen Disaccharide, GalB1,3GalNAc. *J. Biol. Chem.* **273**(11):6312-8
- Li, J. D., J. Carroll, D.J. Ellar. (1991). Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5Å resolution. *Nature* **353**: 815-821.
- Li, J., Pandelakis, A.K., Ellar, D.J. (1996). Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *Kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J. Mol. Biol.* **257**: 129-152.
- Liu, X.S., Dean, D.H. (2006). Redesigning *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin into a mosquito toxin. *Protein Engineering, Design and Selection.* **19**:107-111.
- Luo, K., Lu, Y.J., Adang, M.J. (1996). A 106 kDa Form of Aminopeptidase is a Receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIC δ -Endotoxin in the Brush Border Membrane of *Manduca sexta*. *Insect. Biochem, Molec. Biol.* **26**: 783-791.

- Margalith, Y., Ben-Dov, E., (2000). In:Rechcigl, J.E., Rechcigl, N.A. (Eds.), *Insect Pest Management: Techniques for Environmental Protection*. CRC Press, Boca Raton, p.243.
- Masson, L., Lu, Y., Mazza, A., Brousseau, R., Adang, M. (1995). The Cry1Ac Receptor Purified from *Manduca sexta* Displays Multiple Specificities. *J. Biol. Chem.* **270**(35): 20309-20315.
- Mc Nall, R. J., M.J. Adang. (2003). Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**:999-1010
- Morin, S., Biggs, R. W., Shriver, L., Eilers-Kirk, C., Higginson, D., Holley, D., Gahan, Heckel, D.G., Carriere, Y., Dennehy, T.J., Brown, J.K., Tabashnik, B.E. (2003). Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **100**: 5004-5009.
- Muñoz, C., Rodríguez, C., Aguilar, J.N., Portugal, L., Gómez, I., Saab, G., Soberón, M., Bravo, A. (2009). Oligomerization of Cry11Aa from *Bacillus thuringiensis* Has an Important Role in Toxicity against *Aedes aegypti*. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 75. **23**: 7548-7550.
- Nagamatsu, Y., Toda, S., Koike, T., Miyoshi, Y., Shigematsu, S., Kogure, M. (1998). Cloning, sequencing and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Aa toxin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**:727-734.
- Pérez, C., Fernández, L.E., Sun, J., Folch, J.L., Gill, S.S., Soberón, M., Bravo, A. (2005). *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 18303-18308.
- Platt, K.B., Linthicum, K.J., Myint, K.S.A., Innis, B.L., Lerdthusnee, K., Vaughn, D.W. (1997). Impact of Dengue Virus Infection on Feeding Behavior of *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **57**(2):119-125.
- Porter, A.G., Davidson, E.W., Liu, J.W. (1993). Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitos. *Microbiol. Rev.* **57**: 838-861.
- Putnam, J. L., T. W. Scott. (1995a). The effect of multiple host contacts on the infectivity of dengue-2 virus-infected *Aedes aegypti*. *J. Parasitol.* **81**: 170-174.

- Putnam, J. L., T. W. Scott. (1995b). Blood-feeding behavior of dengue-2 virus-infected *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **52**: 225-227.
- Rajagopal, R., N. Agrawal, A. Selvapandiyan, S. Sivakumar, S. Ahmad, R.K. Bhatnagar. (2003). Recombinantly expressed isozymic aminopeptidases from *Helicoverpa armigera* midgut display differential interaction with closely related Cry proteins. *Biochem. J.* **370**:971-978.
- Regis, L., da Silva, S.B., Melo-Santos, M. (2000). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **95**: 207-210.
- Reiter, P., Gubler, D.J., (1997). Surveillance and control of urban dengue vectors. In: Gubler, D.J., Kuno, G., eds. *Dengue and Dengue hemorrhagic fever*. Wallingford, UK: CAB International. 425-462
- Sangadala, S., F. S. Walters, L..H. English, M.J. Adang. (1994). A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Ac toxin binding and Rb⁺ - K⁺ efflux *in vitro*. *J. Biol. Chem.***269**: 10088-10092.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. VanRie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, D. H. Dean. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:775-806.
- Smirnova, T.A, Minenkova, I.B., Orlova, M.V., Lecade,t M.M., Azizbekyan, R.R. (1996). The crystal-forming strain of *Bacillus laterosporus*. *Res. Microbiol.* **147**: 343-350.
- Soberón, M., Fernández, L.E., Pérez, C., Gill, S.S., Bravo, A. (2007). Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon.* **49**: 597-600.
- Toffazal, H., Kagawa, Y., Sakai H., Hayakawa, T. (2009). Biological properties of loop-replaced mutants of *Bacillus thuringiensis* mosquitocidal Cry4Aa. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* Vol. 108. **3**: 179-183.
- Tuntitippawan, T., Boonserm, P., Katzenmeier G., Angsuthanasombat C. (2004). Targeted mutagenesis of loop residues in the receptor-binding domain of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin effects larvicidal activity. *FEMS Microbiology letters.* **242**:325-332.
- Vadlamudi, R. K., T.H. Ji, L.A. Bulla, Jr. (1993). A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. *J. Biol. Chem.* **268**:12334-12340.

→Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, I., Ji, T. H., Bulla, L. A. Jr. (1995). Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. J. Biol. Chem. **270**: 5490-5494.

→Valaitis, A.P., J.L. Jenkins, M.K. Lee, D.H. Dean, K.J. Garner. (2001). Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. Arch. Insect. Biochem. Physiol. **46**: 186-200.

→Wang, P., X. Zhang, J. Zhang. (2005). Molecular characterization of four midgut aminopeptidase N isozymes from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. Insect Biochem. Mol. Biol. **35**: 611-620

→Xu, X., Yu, L. Wu, Y. (2005). Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. Appl. Environ. Microbiol. **71**:948-954.

→Yamagiwa, M., Sakagawa,, K., Sakai, H., (2004). Functional analysis of two processed fragments of *Bacillus thuringiensis* Cry11Aa toxin. Biosci. Biotechnol. Biochem. **68**: 523-528.

→Zhang, J., Hodgman, C., Krieger, L., Schnetter, W. Schairer, HU, (1997). Cloning and analysis of the first cry gene of *Bacillus popilliae*. J. Bact. **179** (13): 4336-4341.