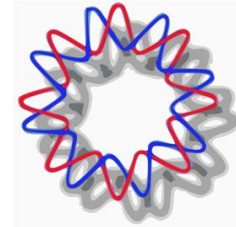
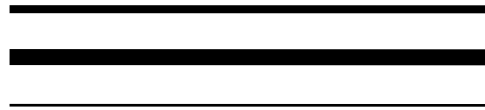


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

**ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD  
EN TOXICIDAD Y SINERGISMO DE  
LA TOXINA Cyt1Aa DE *Bacillus  
thuringiensis ssp. israelensis***

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

PRESENTA:  
**LCG. PABLO EMILIANO CANTÓN  
OJEDA**

TUTOR: **DR. MARIO SOBERÓN CHÁVEZ**



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.



## DEDICATORIAS

Mi formación académica se ha fortalecido por el aporte de mucha gente a lo largo de mi vida, sin la cual ésta hubiera tomado otro rumbo. A todos ellos les debo un profundo agradecimiento. Pero sobre todo, quisiera dedicar este trabajo a aquellas personas que además de nutrir mi carrera también han permitido construirme como un individuo inspirado y alegre, con un deseo y un impulso por realizar tantas cosas y siempre aspirando a ser más y mejor.

A mi hermano **Miguel**, una persona tan brillante como emprendedora, diversa, divertida e interesante, quien me inspiró a seguir su ejemplo, sus pasos, y quien me alentó con sus palabras y su entusiasmo a embarcarme en este camino de vida. Más de una persona se vio motivada por tu energía y yo no fui la excepción. Sé que desde donde quiera que estés ahora me miras con orgullo y con una sonrisa aprobadora. Agradezco todo el tiempo que pudimos compartir y ahora todo lo que hago lo realizo contigo a mi lado.

A mi padres, **Miguel y Elsie**, por ser los seres más espléndidos que he podido conocer. Su apoyo incondicional en todos y cada uno de los ámbitos en mi vida, su amor y cariño inagotable, su incansable paciencia conmigo aún cuando seguro los desespero, todo me ha permitido tener un hogar donde nunca me he faltado nada y que donde he podido perseguir todos mis anhelos sin reserva alguna. Gracias por ofrecerme todo aquello que se puede en esta vida. No hay suficientes palabras para expresar mi gratitud por todo aquello que he recibido.

A todos mis profesores a lo largo de los años, desde mis primeros años hasta la maestría, todos aquellos quienes me enseñaron mucho más que temas y lecciones de libros, que me mostraron de todas las facetas de las que soy capaz y me empujaron a esforzarme y sacar lo mejor de mí. Son tantos y tantas sus contribuciones a mi crecimiento que podría escribir páginas enteras nombrándolos a todos y aún así quedarían cosas por decir. A estos responsables de abrir mi panorama del mundo no me queda más que ofrecerles este trabajo como resultado de su loable labor docente.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se vio nutrido por muchas personas sin las cuáles no podría haber sido realizado. A todos ellos les ofrezco mi más sincero agradecimiento por ayudarme a llegar a este punto.

En primer lugar, agradezco al **Dr. Mario Soberón** por darme lugar en su grupo de trabajo y guiarme en mi carrera por estos ya varios años. Gracias por la confianza depositada en mí para llevar a cabo experimentos arriesgados y por enseñarme a creer en mi trabajo. Ha sido un honor y un placer poder colaborar y recibir las múltiples observaciones atinadas que me han fortalecido profesionalmente y hecho de este trabajo un gusto.

A la **Dra. Alejandra Bravo** por contagiarme su brío de investigación, por brindarme apoyo constante y por ofrecerme siempre ideas nuevas y opiniones importantes que han siempre enriquecido y encausado mi trabajo hacia el éxito. Gracias por permitirme participar en sus proyectos y formar parte de la extendida familia de investigación.

A los doctores **Takuya Nishigaki** y **Gloria Saab** por formar parte de mi comité tutorial y darme siempre su punto de vista honesto y constructivo, y por los comentarios que permitieron a este trabajo ser redondeando y concluido.

Agradezco a los doctores **Gerardo Corzo**, **Joel Osuna**, **Guadalupe Espín** y **Jesús Martínez**, miembros del jurado de examen, por leer mi tesis y dar las aportaciones que permitieron a este trabajo ser pulido y mejorado, y por ofrecerme ideas nuevas sobre el proyecto.

A **Liliana Pardo**, **Claudia Rodríguez**, **Isabel Gómez**, **Carlos Muñoz** y **Helena Porta** por sus incontables consejos y asistencias que me ayudaron a superar los obstáculos enfrentados durante el trabajo experimental. Sin ustedes probablemente seguiría dándome topes con los resultados y no escribiendo agradecimientos en una tesis completada. Su valiosa cooperación me ha permitido refinar mis habilidades técnicas y analíticas y crecer profesionalmente. En especial, a **Liliana** por ser además una

entrañable amiga y consultora de asuntos de la vida y por siempre darme ánimos y esperanzas cuando más los necesitaba, y a **Claudia** por convertirse en un modelo de eficiencia y energía a seguir (y que quizá no llegue a imitar). Ha sido una experiencia increíble trabajar con ambas.

Agradezco a la incomparable **Lizbeth Cabrera** por su inigualable atención con nuestros insectos y su también inigualable cariño y calidez humana. Sin ti, no hubiera podido lograr todo lo que he hecho y no hubiera tenido un oído que me escuchara en las buenas y en las malas.

A **Jorge Sánchez** por su tips mágicos que hacían que los experimentos funcionaran y por su siempre agradable compañía y disposición. Otro de los engranes indiscutibles del equipo. A **Xóchitl González**, sin quien el laboratorio no sería el lugar que es y cuyo apoyo nos mantiene felices y funcionando día con día, y en quien siempre se puede contar para sacarte una sonrisa.

A **Sergio Blancas**, no sólo por tenerme paciencia con mis múltiples pedidos de reactivos y medios, sino por compartir el espacio por tanto tiempo. Gracias, Checo, por ser un excelente colega y compañero de mesa, compartir tantas horas y hacer de ese lugar un nicho tan agradable.

A los muchos, muchos amigos y compañeros de laboratorio, que se han convertido en mi familia sustituta y a quienes admiro y celebro su compañía. A **Claudita, Luisa y Nuria** por recibirme y crear un lugar cálido en sus corazones y darme ánimos que me han permitido seguir cuando la veía difícil. A la única **Ángeles** por ser mi amiga y mitad defensora, y compartir conmigo tantas y tantas pláticas y ser, como lo sigo diciendo, la alegría del laboratorio. A **Luis Enrique, Josué y Leivi**, mis amigos que avanzamos hombro a hombro, por volverse personas a quienes estimo muchísimo y que me hacen sonreír cada día. A **Raquel, Cynthia, Betty, Alan, Leidy, Erandi, Tere, Teresita, Diana, Daniela, Biviana, Roberto, Iñigo, Gladys, Sabino, Mónica, Rosalba, Ramiro, Nato, Abiud, Iván, Fernando, Blanca, Jazmín, Violeta** y los que vendrán, por darme tantos momentos gratos y ayudarme en todo momento que lo he necesitado. En especial, a **Esmeralda**, sin quien no hubiera podido terminar este trabajo, quien además de colaboradora ha sido una excelente amiga. A todos, gracias.

A **Toño, Orly, Pata, Eduardo, Marco, Krystin, Mash**, y demás amigos que entendieron y me excusaron las muchas fiestas, cumpleaños, viajes, despedidas y celebraciones a las que no pude asistir por quedarme en el laboratorio, y por recibirme con cariño cuando sí llegaba.

A **Graciela Domínguez**, por hacer pases mágicos y lograr que nuestro laboratorio no colapse. Indispensable y siempre una divertida amiga, Chela, gracias por todas tus salvadas (y las que aún faltan).

Agradezco a la unidad de síntesis y a la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología por sus servicios y atenciones durante la realización de este proyecto.

A **Jalil Saab, Antonio Bolaños y Gloria Villa** en la unidad de Docencia por resolver todas mis dudas e inquietudes y la asistencia en todo momento, y por sus invaluable servicios.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Mario Soberón Chávez.



## Índice

Índice de figuras .....	10
Índice de tablas .....	11
Abreviaturas.....	12
1. Resumen .....	13
2. Introducción.....	15
3. Antecedentes.....	17
3.1 Generalidades de las toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	17
3.2 Efectos de la toxina Cyt1Aa .....	20
3.3 Relaciones de estructura-función de proteínas Cyt para su toxicidad.....	21
3.4 Cyt1Aa como receptor y su efecto sinérgico.....	25
3.5 Papel de las asas del dominio II de toxinas Cry en unión a receptores .....	27
3.6 Principios de Fluorescencia para estudios biológicos .....	29
3.7 Despliegue en fago M13.....	31
4. Hipótesis .....	35
5. Objetivo General.....	36
6. Objetivos Particulares.....	36
7. Materiales y Métodos .....	37
7.1 Producción y recuperación de espora/cristal de toxinas.....	37
7.2 Purificación de cristales de toxinas .....	37
7.3 Solubilización y activación de toxinas .....	38
7.4 Biotinación de Cyt1Aa activada.....	39
7.5 Purificación de Cyt1Aa activada .....	39
7.6 Concentración de Cyt1Aa.....	40
7.7 Marcaje fluorescente de toxina Cyt1Aa activada.....	40
7.8 Apagamiento de fluorescencia con KI.....	40
7.9 Ensayo de Hemólisis .....	41
7.10 Disección de larvas.....	42
7.11 Preparación de vesículas de microvellosidad apical (VMMA) de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Manduca sexta</i> .....	43
7.12 Preparación de liposomas .....	43
7.13 Western Blot para Cyt1Aa.....	44
7.14 Tratamiento con Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> en VMMA.....	45
7.15 Ensayo competitivo en placa .....	45

7.16 Propagación de fagos.....	46
7.17 Cálculo de título de fagos .....	47
7.18 Unión de fagos a VMMA y tratamiento con Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	47
7.19 Bioensayos con <i>Aedes aegypti</i> y sinergismo .....	48
7.20 Ensayos de unión por ELISA .....	48
7.21 Ensayos tipo Ligand-Blot .....	49
8. Resultados.....	50
I: Especificidad en la toxicidad de Cyt1Aa .....	50
8.1 Solubilización de Cyt1Aa.....	50
8.2 Activación y oligomerización.....	52
8.3 Unión de Cyt1Aa a membranas.....	55
8.4 Purificación de Cyt1Aa activada .....	60
8.5 Inserción de Cyt1Aa en VMMA .....	64
II: Discriminación de especificidad en contexto de despliegue en fagos .....	66
8.6 Despliegue en fagos de Cyt1Aa.....	66
8.7 Selección de fagos en VMMA.....	68
III: Especificidad en interacción con toxinas Cry de <i>Bti</i> .....	70
8.8 Mutantes de Cyt1Aa y Cry4Ba.....	70
8.9 Efectos <i>in vivo</i> sobre el sinergismo .....	73
8.10 Unión entre Cyt1Aa y Cry4Ba .....	76
9. Discusión .....	79
10. Conclusión.....	88
11. Perspectivas .....	89
12. Bibliografía.....	93
13. ANEXO: Publicación original. “Binding of <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism.” .....	98

## INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Micrografía de <i>Bacillus thuringiensis</i> en fase de esporulación.....	15
Figura 3.1 Conservación estructural de toxinas Cry.....	17
Figura 3.2 Mecanismo de acción de Cry1Ab. ....	19
Figura 3.3 Estructura cristalina de Cyt2Aa .....	19
Figura 3.4 Modelo de Cyt1Aa y la ubicación de estructuras secundarias en su secuencia .....	22
Figura 3.5 Modelo de poro para Cyt2Aa.....	24
Figura 3.6 Despliegue de Cyt1Aa en membrana.....	27
Figura 3.7 Diagrama de Jablonski para la fluorescencia. ....	30
Figura 3.8 Espectro de absorción y emisión del sulfato de quinina .....	31
Figura 3.9 Descripción del sistema de despliegue de M13 Phaberge .....	34
Figura 8.1 Mediciones de pH intestinal de <i>Aedes aegypti</i> .....	50
Figura 8.2 Mediciones de pH intestinal de lepidópteros .....	51
Figura 8.3 Cyt1Aa solubilizada en diferente pH .....	52
Figura 8.4 Activación de Cyt1Aa con diferentes proteasas.....	53
Figura 8.5 Oligomerización de Cyt1Aa durante activación en presencia de liposomas. ....	54
Figura 8.6 Incubación de Cyt1Aa con VMMA en diferente pH. ....	56
Figura 8.7 Competencia de Cyt1Aa biotinada en la unión a VMMA por Cyt1Aa silvestre.....	57
Figura 8.8 ELISA cuantitativo de unión de Cyt1Aa a VMMA de <i>Aedes aegypti</i> y de <i>Manduca sexta</i> . ....	59
Figura 8.9 Ubicación de posibles sitios de marcaje con fluoróforos extrínsecos en Cyt1Aa.....	61
Figura 8.10 Condiciones para procesamiento completo de Cyt1Aa por proteinasa K... ..	62
Figura 8.11 Cromatografía de Cyt1Aa por intercambio iónico.....	63
Figura 8.12 Comparación de Cyt1Aa en diferentes puntos de purificación.....	63
Figura 8.13 Marcaje de Cyt1Aa con Alexa-350 y la verificación de la unión de fluoróforo.....	64
Figura 8.14 Curvas de apagamiento de Cyt1Aa-Alexa 350 con KI. ....	65
Figura 8.15 Construcciones para despliegue de Cyt1Aa en fusión con P3 en Phaberge .....	67
Figura 8.16. Despliegue de Cyt1Aa en Phaberge.....	68
Figura 8.17 Selección de fagos fusión en VMMA en diferentes condiciones de incubación.....	69
Figura 8.18. Producción y activación de mutantes de Cyt1Aa.....	71
Figura 8.19. Producción de toxinas Cry4. ....	71
Figura 8.20. Activación de mutantes en Cry4Ba.....	72
Figura 8.21. Ubicación de mutantes de Cyt1Aa y Cry4Ba. ....	73
Figura 8.22. Ligand blot entre Cyt1Aa y Cry4Ba y mutantes.....	76
Figura 8.23. Curva de unión por ELISA entre Cyt1Aa y Cry4Ba .....	77
Figura 8.24. Ensayos de unión diferencial entre Cyt1Aa y Cry4Ba por ELISA.....	78

## INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Uso de cultivos transgénicos de <i>Bt</i> .....	16
Tabla 7.1 Condiciones experimentales para curva de apagado de fluorescencia con KI. .....	41
Tabla 8.1. LC50 de toxinas.....	74
Tabla 8.2. Ensayos de sinergismo entre Cyt1Aa y toxinas Cry4. ....	75

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Bt	Bacillus thuringiensis
Bti	Bacillus thuringiensis ssp israelensis
cfu	Unidades formadoras de colonia
Cry	Crystal
Cyt	Cytolytic
DEAE	Dietilaminoetil celulosa
EDTA	Ácido endiaminotetraacético
FRET	Transferencia de energía por resonancia de Förster
GPI	Glicofosfatidil inositol
HCT	Hidrolizado de caseína y tripsina
Kd	Constante de afinidad
kDa	Kilo Daltones
LB	Luria Bertani
m	Mili ( $10^{-3}$ )
M	Molar
mAmp	Miliamperes
n	Nano ( $10^{-9}$ )
nm	Nanómetros
NMWL	Límite nominal de peso molecular
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PEG	Polietilen glicol
pI	Punto isoeléctrico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes
SUV	Vesículas unilamelares pequeñas
Trp	Triptófano
2xTY	Medio triptona y extracto de levadura
$\mu$	Micro ( $10^{-6}$ )
$\mu$ l	Microlitro ( $10^{-6}$ litros)

## 1. RESUMEN

La bacteria *Bacillus thuringiensis* representa una alternativa viable al uso de insecticidas sintéticos o químicos por su producción de proteínas tóxicas hacia insectos con un alto grado de especificidad y fácil degradación en el ambiente. En particular, la subespecie *Bacillus thuringiensis israelensis* se ocupa en el combate de vectores transmisores de enfermedades, principalmente mosquitos. Esta subespecie produce cuatro toxinas con actividad insecticida: Cry11Aa, Cry4Aa, Cry4Ba y Cyt1Aa. En especial la toxina Cyt1Aa presenta un efecto sinérgico y de retraso de resistencia al combinarse con las otras toxinas de la bacteria, además de presentar un efecto tóxico individual. Aún no son definidas las bases bioquímicas de la especificidad de Cyt1Aa hacia ciertos insectos blanco y el mecanismo de acción propuesto para la toxina aún no se ha elucidado por completo. Por otro parte, se sabe que Cyt1Aa puede sinergizar a Cry11Aa cuando entran en contacto por regiones específicas y que favorece la oligomerización y formación de poro de esta última. No se sabía si esta propiedad es compartida con otras toxinas con las que sinergiza.

En este trabajo se compararon las propiedades de Cyt1Aa al interactuar con vesículas derivadas de las membranas apicales de las células epiteliales intestinales (VMMA) del insecto sensible *Aedes aegypti* y el no sensible *Manduca sexta*. Se observó que Cyt1Aa es capaz de solubilizarse y activarse en las condiciones esperadas en intestinos tanto de *A. aegypti* como *M. sexta*. Se observó también que la unión de Cyt1Aa a las VMMA no se veía afectada por la presencia de biotina en las lisinas ni por el cambio a pH alcalinos, aunque a pH muy ácido parece que se disocia de VMMA de *M. sexta*. En experimentos de competencia se vio que a muy altas concentraciones de Cyt1Aa silvestre se podía evitar la unión de Cyt1Aa biotinada con mayor facilidad en VMMA de *M. sexta* que *A. aegypti*. Sin embargo, la afinidad de Cyt1Aa por las VMMA es similar. Además, cuando se incuban las VMMA con Cyt1Aa marcada fluorescentemente se observó que en las membranas de ambos insectos la hebra  $\beta_6$  del dominio C-terminal se inserta a un grado igual, medido mediante accesibilidad al solvente por apagamiento con KI. Por otra parte se estableció que Cyt1Aa en forma de protoxina se puede emplear para el sistema de despliegue en fagos y que en este contexto es posible detectar una unión preferencial a VMMA de *Aedes aegypti* sobre

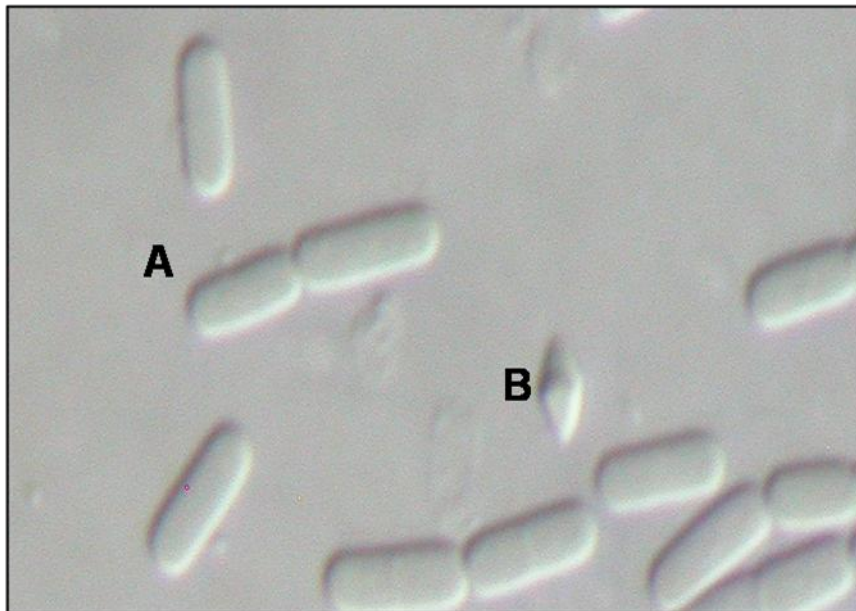
*Manduca sexta* cuando se permite una unión lenta a baja temperatura y se da un breve shock térmico.

Por otro lado se produjeron mutantes de K198A, E204A, y K225A de Cyt1Aa, en los epítopes de interacción con Cry11Aa, y mutantes de Cry4Ba en el asa  $\alpha 8$  su dominio II. Al combinar mutantes de Cyt1Aa con Cry4Ba o sus mutantes se vio una reducción en el grado de sinergismo observable contra larvas de *Aedes aegypti*. La mutante E204A de Cyt1Aa también mostró una reducción en sinergismo con Cry4Aa. La reducción en sinergismo entre Cry4Ba y Cyt1Aa se puede atribuir a una reducción en unión entre las toxinas, demostrado mediante uniones tipo Ligand Blot y también por ensayos de ELISA.

Cyt1Aa presenta un rango limitado de insectos contra los cuáles es tóxica. *In vitro* los ensayos realizados no permiten definir de forma absoluta cuál es la base bioquímica de la especificidad de la toxina activada aunque los datos apunta a que es mayor la unión con las membranas de *A. aegypti* que *M. sexta*, visto por competencia y en el contexto de fusión a P3 del fago M13. Esto permite establecer condiciones para tamizajes de bibliotecas de Cyt1Aa a través de este sistema. Además, se demostró que el Cyt1Aa es capaz de sinergizar a todas las toxinas Cry de *Bti* al funcionar como un receptor auxiliar codificado por la bacteria. Este mecanismo compartido apunta a la mayor relevancia de Cyt1Aa como agente de sinergia que como agente tóxico.

## 2. INTRODUCCIÓN

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es una bacteria Gram-positiva que se puede encontrar en el suelo de una gran variedad de ambientes alrededor del mundo. Cuando la bacteria percibe condiciones adversas a su desarrollo, por ejemplo por privación de nutrientes, ésta entra en un proceso de esporulación para asegurar su supervivencia. Como parte de este proceso de esporulación la bacteria produce un conjunto de proteínas que se acumulan en forma de inclusiones cristalinas paraesporales (Figura 2.1). Una característica de estas proteínas es que presentan toxicidad específica contra diversos órdenes de insectos e incluso nemátodos [1]. Cada subespecie de *Bacillus thuringiensis* codifica para una diferente combinación de toxinas y esto es lo que le confiere especificidad hacia el insecto blanco. Dada la especificidad de blanco y su naturaleza proteica, las toxinas de *Bt* se han utilizado como una alternativa biodegradable e inocua para humanos en el control de plagas en cultivos de interés económico o como control de vectores de enfermedades, principalmente los mosquitos.



**Figura 2.1 Micrografía de *Bacillus thuringiensis* en fase de esporulación.** A. Bacilo en etapa vegetativa. B. Cristal de Cry1Ab liberado de esporangio. (Cortesía de Biol. Leivi Portugal)

La especificidad de las toxinas de *Bt* permite el uso de una subespecie particular de *Bt* para un objetivo determinado. Por ejemplo, en 2007 existían millones de hectáreas de



cultivos tratados con *Bt* a nivel mundial, que corresponden a cultivos transgénicos de plantas que expresan toxinas de *Bt*, entre los que destacan maíz, algodón y soya [2] (Tabla 2.1). De igual manera, preparaciones de la subespecie *Bacillus thuringiensis israelensis* se han utilizado para controlar a las especies de mosquito *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*. Esto es para reducir el esparcimiento del virus del dengue y del parásito que produce malaria, respectivamente.

<b>Tipo de Cultivo</b>	<b>Hectáreas (millones)</b>	<b>% del área total</b>
Tolerancia a herbicidas glifosato	69.9	68
Resistencia a insectos <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt)	19	19
Combinada	13.1	13

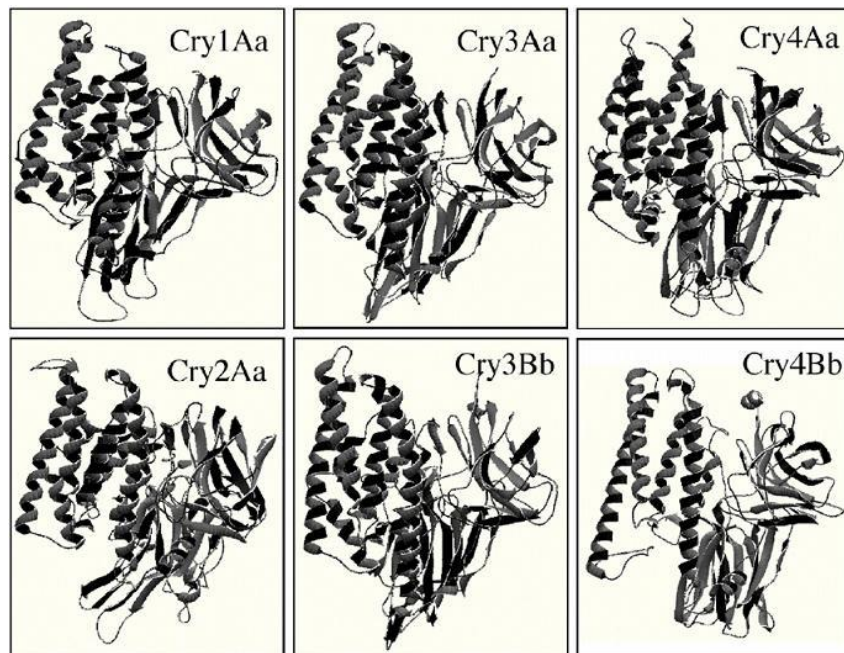
**Tabla 2.1** Uso de cultivos transgénicos de *Bt*

Al igual que con otras formas de combate contra insectos, una preocupación persistente para el futuro de esta tecnología es que el uso continuo de las toxinas de *Bt* en campos de cultivo o para control de vectores promueva la aparición de resistencia en poblaciones silvestres. La búsqueda de las bases moleculares de la actividad y especificidad de estas toxinas nos permite desarrollar estrategias de mejora en la utilización de esta tecnología y también el diseño dirigido de toxinas más potentes o que combatan la resistencia.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Generalidades de las toxinas de *Bacillus thuringiensis*

Las toxinas de *Bt* pertenecen a un grupo de toxinas denominadas las  $\delta$ -endotoxinas formadoras de poro. El blanco principal de acción de estas toxinas son las células que conforman el tejido epitelial del intestino de las larvas. Aunque en muchos casos no exista alta conservación de secuencia de aminoácidos entre las toxinas de los distintos linajes de *Bacillus thuringiensis*, el análisis de la estructura de algunas proteínas de la familia que se han cristalizado permite observar una conservación en estructura tridimensional. Con esta evidencia se han clasificado de acuerdo a homología y estructura en dos grandes familias denominadas Cry (por “crystal” en inglés) y Cyt (por “cytolytic” en inglés) [3].

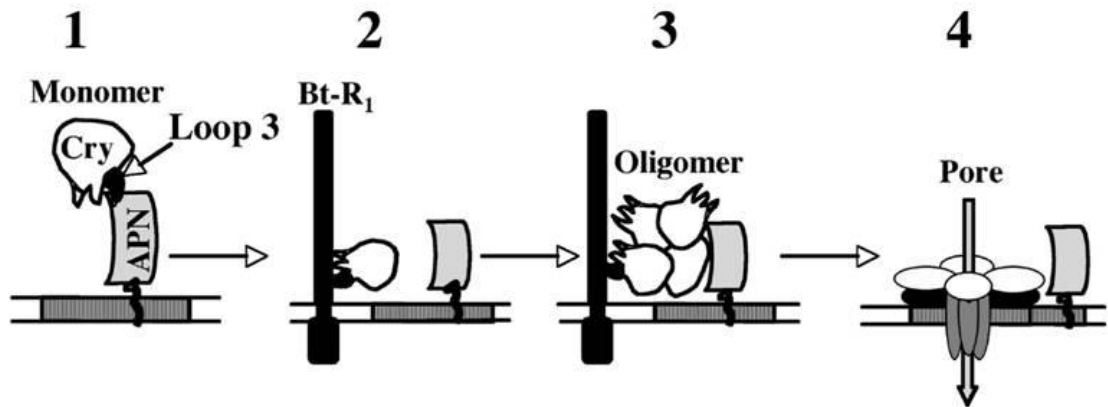


**Figura 3.1 Conservación estructural de toxinas Cry.** Las toxinas Cry conservan la estructura de tres dominios.[4]

Las toxinas Cry son compuestas por tres dominios estructurales (Figura 3.1). El dominio I se encuentra formado por 7  $\alpha$ -hélices donde 6 de ellas rodean a una hélice central de carácter más hidrofóbico. Este dominio se ha propuesto que participa en la

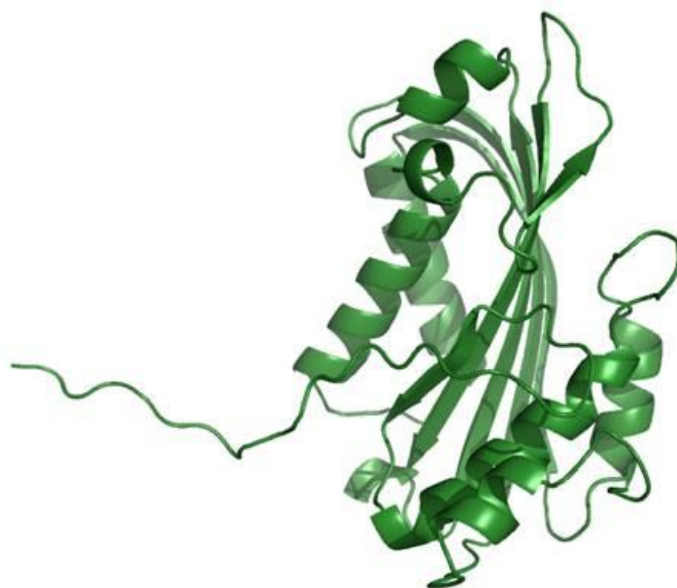
asociación de varias unidades de la toxina en un oligómero y en la penetración de la toxina en la membrana blanco [5]. Los dominios II y III están compuestos por estructuras de  $\alpha/\beta$  sándwich. Se ha observado que diversas regiones de estos dominios están involucradas en contacto con receptores en las células blanco y que de esta forma confieren la especificidad de la toxina en cuestión [6, 7]. El mecanismo de acción de las toxinas Cry se ha caracterizado principalmente en especies lepidópteras que son plagas de cultivos. Los estudios han llevado a proponer el siguiente mecanismo para su efecto tóxico [8] (Figura 3.2):

1. Las toxinas Cry son producidas en forma de protoxina la cual conforma los cristales. El cristal ingerido por la larva es solubilizado en las condiciones alcalinas y reductoras intestinales.
2. La toxina liberada del cristal es expuesta a la acción de proteasas que eliminan segmentos del extremo C-terminal y N-terminal de la protoxina, dejando un monómero activo.
3. La toxina se une a un receptor en la membrana de alta abundancia con baja afinidad identificado como Aminopeptidasa-N o Alcalino-fosfatasa, ambos anclados por GPI.
4. La toxina después se une a un receptor tipo caderina con alta afinidad. Aquí sufre un cambio conformacional que permite el corte del  $\alpha$ -hélice 1. Este corte favorece la exposición de dominios que inducen una oligomerización de monómeros activados.
5. El oligómero adquiere mayor afinidad por Aminopeptidasa-N o Alcalino-fosfatasa y su segunda interacción conlleva a su ubicación en dominios de balsas lipídicas.
6. El oligómero se inserta en la membrana abriendo un poro por el cual se permite un flujo de iones y así un desbalance osmótico. Este desbalance conlleva la lisis celular. Cuando han ocurrido muchos de estos eventos, el daño al tejido epitelial provoca la muerte de la larva.



**Figura 3.2 Mecanismo de acción de Cry1Ab.** Esquema representando la unión secuencial de toxinas Cry a proteínas de membrana. 1: Unión a APN de baja afinidad por el monómero. 2: Unión a caderina. 3: unión de alta afinidad a APN por el oligómero. 4: Inserción de oligómero y formación de poro[8]

Las toxinas de la familia Cyt difieren tanto en secuencia como en estructura de las toxinas de la familia Cry. Se ha reportado un menor número de toxinas Cyt que Cry y casi exclusivamente en las cepas de *Bt* que infectan especies dípteras [9]. Las toxinas Cyt presentan un solo dominio  $\alpha/\beta$  donde dos “hairpins” de hélices  $\alpha$  rodean a una lámina interior conformada exclusivamente por hebras  $\beta$  (Figura 3.3) [10]. En contraste con el fragmento tóxico de las toxinas Cry que tiene un peso promedio de 60 kDa, la unidad tóxica de las toxinas Cyt ronda solamente en los 20 a 23 kDa. Mientras que el mecanismo de acción de las toxinas Cry ha sido muy detallado, especialmente en especies lepidópteras, el mecanismo de acción de las toxinas Cyt no es aún muy claro y se mencionará la evidencia acumulada más adelante.



**Figura 3.3 Estructura cristalina de Cyt2Aa.** Imagen generada a partir del PDB 1CBY. [10]

### 3.2 Efectos de la toxina Cyt1Aa

La subespecie *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) produce un cristal paraesporal compuesto principalmente por las toxinas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa y Cyt1Aa. Todas las toxinas que conforman este cristal presentan una especificidad contra insectos de especies dípteras (mosquitos, moscas), algunos coleópteros y incluso algunos homópteros [11]. Se ha observado que Cyt1Aa presenta toxicidad contra dípteros pero no contra lepidópteros [12]. Las toxinas Cry conservan la estructura de tres dominios de esta familia y existe evidencia de que los receptores involucrados en su interacción son similares a aquellos de las toxinas Cry que actúan en lepidópteros [13]. La toxina Cry11Aa presenta un forma de protoxina más pequeña (70 kDa) y sufre un corte proteolítico interno durante su activación, aunque ambos fragmentos permanecen unidos.

Se ha observado que la toxicidad de cada una de las toxinas de *Bti* por separado es menor que la toxicidad cuando actúan en conjunto, fenómeno que se denomina sinergia. En particular se ha observado que la toxina Cyt1Aa es capaz de sinergizar por separado la actividad de cada una de las toxinas de *Bti* [14] y algunos estudios sobre esta fenómeno se detallarán más adelante. La intensidad de este efecto sinérgico y la presencia de Cyt1Aa en el cristal se han atribuido a la falta de aparición de resistencia en poblaciones en campo expuestas a preparaciones de esta mezcla de toxinas.

Existen algunas particularidades sobre Cyt1Aa que podrían explicar la dificultad para desarrollar resistencia. A diferencia de las toxinas Cry, se ha observado que las toxinas Cyt no requieren de un receptor de origen proteico para desempeñar su acción en la membrana. Estudios han demostrado que la toxina Cyt2Aa une específicamente a lípidos con ácidos grasos insaturados y que la carga de la cabeza polar parece no influir demasiado en esta unión [15]. Considerando este tipo de reconocimiento un mecanismo de resistencia esperado sería cambiar la composición de lípidos en la membrana de las células blanco, pero dicho cambio podría tener implicaciones amplias para la supervivencia del insecto. La falta de un receptor único ha llevado en algunos casos a denominar a la toxina Cyt1Aa como inespecífica ya que también se ha observado que *in vitro* es capaz de lisar diferentes tipos celulares [16]. La prueba de hemólisis de eritrocitos es ampliamente utilizada para evaluar la actividad de toxinas Cyt. Sin

embargo, se debe recordar que *in vivo* existe un rango limitado de insectos susceptibles a toxinas Cyt.

Se ha propuesto que las toxinas Cyt actúan de forma oligomérica, pero el número de subunidades que conformarían dicho oligómero no es conocido. El número de subunidades debe ser grande debido a que se ha observado que existe liberación de moléculas de tamaño grande desde el interior de liposomas de fostadilcolina tratados con Cyt1Aa [17]. La actividad de Cyt2Aa parece ocurrir en dos eventos. Primero, la toxina se une a la membrana. Una vez en ella, se asocia con otras subunidades para formar el oligómero e inducir la formación de poro. El segundo paso aparenta depender de la interacción y contacto de monómeros unidos a la membrana ya que, aunque se retiene la unión a membranas a 4 °C, sólo se observa actividad hemolítica cuando la temperatura se eleva, por ejemplo a 37°C [18]. También se ha visto que Cyt2Aa parece formar agregados de hasta 400 kDa cuando se encuentra en la membrana. Un efecto similar se observó al incubar tubos de Malpigio con toxina activada, donde también se concluye que a temperatura baja sólo se une la toxina y que es hasta elevar la temperatura que los monómeros se asocian y perforan la membrana [19]. Sin embargo la evidencia apunta a que no hay difusión lateral de los monómeros y que esa asociación podría más bien depender de algún cambio conformacional de la toxina.

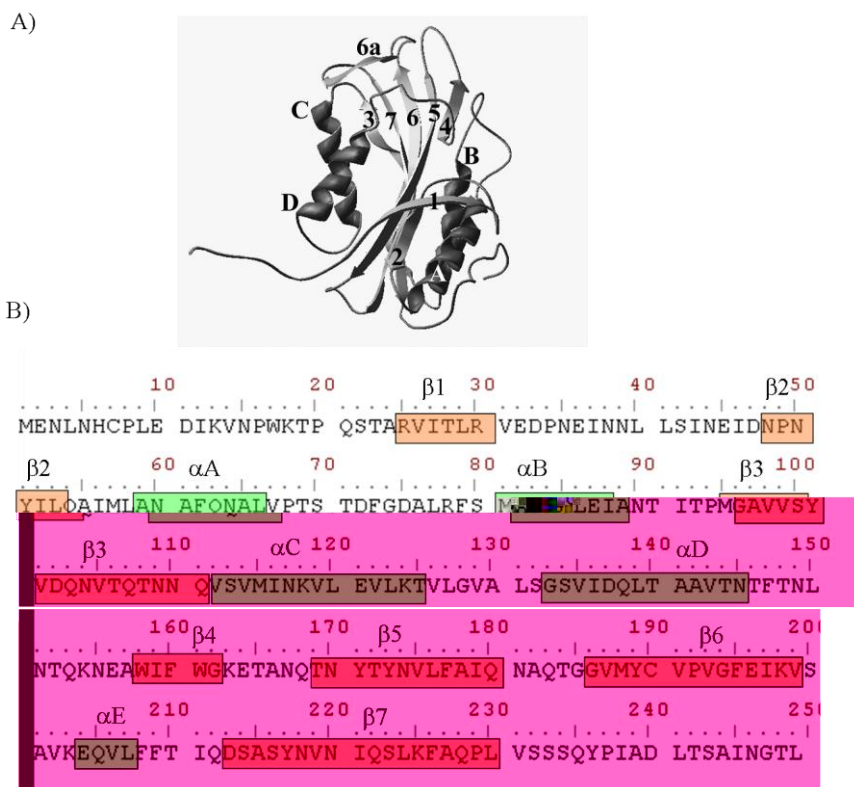
### **3.3 Relaciones de estructura-función de proteínas Cyt para su toxicidad**

Cyt1Aa desempeña funciones de toxicidad individual así como sinérgicas con las toxinas Cry de *Bti*. Diferentes estudios han demostrado que existen motivos estructurales discretos en Cyt1Aa que se encuentran involucrados en cada uno de estos procesos.

En 1996 se obtuvo la estructura cristalográfica de Cyt2Aa [10], una proteína con 39% de identidad con Cyt1Aa [20], y se muestra en la figura 3.3. En ese trabajo se observó que la protoxina de Cyt2Aa (denominada entonces CytB) contaba con 7 hebras  $\beta$  y 5 hélices  $\alpha$ . La hebra  $\beta$ 1 parece estar involucrada en la formación de un dímero en los cristales de Cyt2Aa, aunque esta región es eliminada durante el procesamiento de protoxina a toxina. También en este trabajo se observó que si la toxina formara un poro

éste tendría que involucrar a las hebras  $\beta$  centrales ya que son las únicas regiones con la extensión suficiente para atravesar una membrana plasmática y que además presentan el mayor carácter hidrofóbico. En este modelo una cara de la hebra miraría hacia la membrana y la otra hacia el lumen acuoso del poro. La figura 3.4 muestra cómo las observaciones de estructura del cristal de Cyt2Aa se aplican a Cyt1Aa.

Para investigar la interacción de las toxinas Cyt con la membrana se han llevado a cabo diferentes tipos de aproximaciones. Por ejemplo, Butko P., *et al.* estudiaron diversas propiedades de Cyt2Aa [21] al interactuar con membranas. Observaron que la fluorescencia intrínseca de los triptófanos de la proteína se veía disminuida pero que no existía un corrimiento hacia el espectro azul de la emisión de estos residuos lo que indicaba que permanecían en un ambiente polar o expuesto. En este trabajo también se determinó por dicroísmo circular y otros métodos que la interacción con liposomas de fosfatidilcolina inducía una relajación del plegamiento de la toxina pero que no existían cambios notables en el contenido de estructuras secundarias. Esto sugiere un despliegue de la toxina en la membrana y no un cambio radical en la estructura de hélices  $\alpha$  y hebras  $\beta$ .

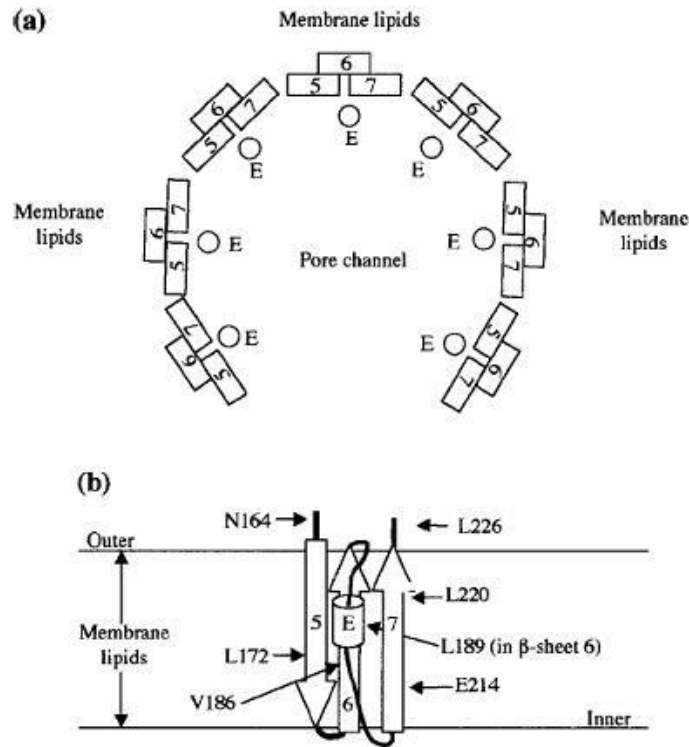


**Figura 3.4 Modelo de Cyt1Aa y la ubicación de estructuras secundarias en su secuencia.** A) Modelo de Cyt1Aa basado en Cyt2Aa (PDB 1CBY). B) Estructuras secundarias. Las hélices se indican con  $\alpha$  y las hebras con  $\beta$ . Se denomina a  $\alpha$ E de Cyt2Aa como  $\beta$ 6a. [22]

Los triptófanos de las toxinas Cyt resultan ser indispensables para su función. En un estudio realizado por Promdonkoy [23] se observó que en Cyt2Aa los residuos Trp132, Trp154 y Trp157 son clave en el funcionamiento de la toxina. Mientras que la mutación de Trp157 por fenilalanina conservaba actividad hemolítica y era tóxica contra mosquitos, la mutación por valina abolía la función lo que sugiere que esta posición requiere de un aminoácido aromático y no sólo hidrofóbico. Todas las mutaciones hechas en Trp132 y Trp154 llevaban a una pérdida de función de Cyt2Aa. Los aminoácidos Trp154 y Trp157 son conservados en Cyt1Aa y, aunque la importancia de esos residuos no ha sido evaluada en esa toxina, la conservación en secuencia y en estructura permite suponer un papel similar.

Por otra parte, Promdonkoy y Ellar indagaron sobre la inserción de distintas regiones de Cyt2Aa en liposomas de fosfatidilcolina, colesterol y estearilamina en proporción 10:3:1 [24]. Para esto, hicieron mutantes de la toxina con una sola cisteína que después era usada para marcar con el fluoróforo acrilodan, el cual tiene una emisión de fluorescencia sensible a la polaridad de su entorno. Con este estudio se determinó que las hebras  $\beta$  5, 6 y 7 que conforman el extremo C-terminal de Cyt2Aa se ubican en un ambiente más hidrofóbico al contacto con liposomas y que este cambio es reversible si se extrae a la toxina de las membranas sintéticas con detergentes. Con la información presentada en su trabajo, los autores establecen un modelo de poro para la interacción de Cyt2Aa con la membrana donde el lumen estaría delineado por las hebras  $\beta$  de la toxina mientras que el resto de la toxina se despliega sobre la superficie adquiriendo una forma de “sombriilla” (Figura 3.5).





**Figura 3.5 Modelo de poro para Cyt2Aa.** A) Esquema representando los monómeros rodeando al lumen del poro por las hebras  $\beta$  5,6 y 7 y el  $\alpha$ E. B) Ubicación transmembranal del dominio C-terminal de Cyt2Aa, denotando los aminoácidos mapeados con marcaje con acrilodan. [24]

Otra evidencia a favor de la inserción del dominio C-terminal de las toxinas Cyt en la membrana proviene del trabajo de Du [25]. En este trabajo se determinó que el extremo C-terminal de las toxinas Cyt1Aa y Cyt2Aa es protegido de proteólisis cuando se incubaba con vesículas sintéticas. Además, aún después de proteólisis, el extremo C-terminal retenía la capacidad de liberar glucosa atrapada en estas vesículas. Esto apunta no sólo a la inserción de esta región sino a su funcionalidad en la formación de poro.

En conjunto, la evidencia ha llevado a proponer que a concentraciones bajas las toxinas Cyt se insertan en membrana mediante un modelo de sombrilla. Un mecanismo de acción general sería el siguiente:

1. El cristal de toxina es ingerido por la larva susceptible.
2. Éste es solubilizado en el ambiente intestinal y la toxina liberada es procesada por proteasas intestinales.
3. La toxina entonces se une a las membranas donde los hairpins se abren como las varillas de la sombrilla y permiten la inserción de las hebras  $\beta$  del C-terminal en la membrana [24].

4. La asociación de un número no conocido de monómeros delinearía un poro de hebras  $\beta$ , que provocaría lisis celular por un desbalance osmótico.

A concentraciones altas de Cyt se ha propuesto que la toxina activada se agrega en las membranas y ejerce un efecto detergente, para lo cual no requiere inserción profunda en la membrana. Hay que hacer notar que los modelos propuestos no son excluyentes entre sí, ya que ambas podrían ocurrir *in vivo*, sólo que en diferentes rangos de intoxicación.

Los estudios de estructura-función mencionados se han hecho en membranas sintéticas y podrían no reflejar el ambiente lipídico donde actúa Cyt1Aa *in vivo*. Además, utilizando diferentes tipos de liposomas y concentraciones de toxina se ha llegado a modelos de mecanismo de acción diferentes (detergente vs. poro) [22]. Dada la ausencia de receptores proteicos específicos para la toxina se debe estudiar el comportamiento de la toxina en un contexto similar al encontrado *in vivo*. Además, la actividad *in vivo* de la toxina Cyt1Aa es más limitada que la que se ha reportado *in vitro* lo que sugiere que sí existe alguna diferencia que altera la forma en que la toxina actúa en los sistemas probados. De esta forma, el mecanismo de acción y la especificidad en toxicidad *in vivo* de Cyt1Aa sigue siendo de alto interés sobre todo por su potencial uso contra otras especies de insecto como los lepidópteros, que son plagas agrícolas, y donde la existencia de resistencia a las toxinas Cry eliminaría la efectividad de cultivos transgénicos.

### **3.4 Cyt1Aa como receptor y su efecto sinérgico**

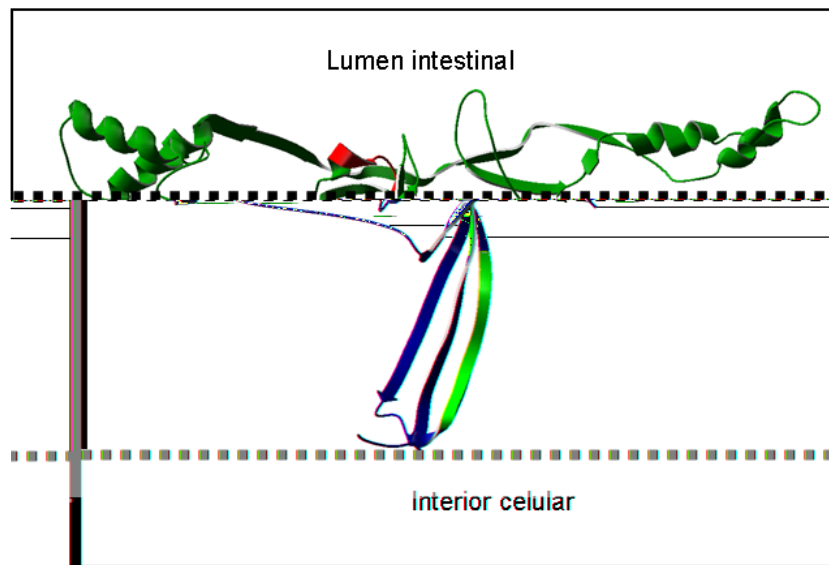
Además de su actividad tóxica individual, las proteínas Cyt se han visto que poseen la capacidad de sinergizar la letalidad de diversas toxinas Cry. Desde la clonación y expresión inicial de las toxinas de *Bti* se observó que la proteína que ahora se sabe es Cyt1Aa podía sinergizar la toxicidad de Cry11Aa [26] y Cry4Ba o Cry4Aa [14]. En ese momento no se conocían las razones de este sinergismo pero se sabía que este efecto era importante en la efectividad de la acción de *Bti* contra mosquitos.

Después se vio que Cyt1Aa estaba directamente involucrada en la disminución de resistencia de las poblaciones de insectos. Por ejemplo, en un trabajo se buscó establecer líneas de mosquitos resistentes a las toxinas de *Bti*. Aunque se pudo establecer una línea resistente a Cry11Aa, Cry4Ba y Cry4Aa no fue posible obtener una

población estable resistente a Cyt1Aa [27]. Incluso observó que Cyt1Aa podía recuperar la toxicidad de las toxinas Cry4Ba y Cry4Aa por encima de lo esperado por la actividad individual de Cyt1Aa [28]. En otro trabajo también observó que la presencia de Cyt1Aa en una mezcla con Cry11Aa retrasaba la aparición de resistencia hacia Cry11Aa [29]. En conjunto esta evidencia apunta a la importancia de Cyt1Aa como agente para controlar resistencia mediante la sinergia que establece con las otras proteínas producidas por *Bti*. Interesantemente, en trabajos posteriores, se observó que Cyt1Aa era capaz de sinergizar a toxinas no provenientes de *Bt* contra mosquitos como es el caso de la toxina Bin de *Bacillus sphaericus* [30]. Este efecto era compartido con las toxinas homólogas Cyt1Ab y Cyt2Ba [31]. Hay que recordar que estos efectos sinérgicos no son observados en insectos no susceptibles a *Bti* como son diferentes especies lepidópteras [12].

Aunque se sabía que Cyt1Aa podía sinergizar a las toxinas Cry de *Bti*, la naturaleza del mecanismo no era conocida. El trabajo de Pérez, C. permitió elucidar que la sinergia de Cry11Aa con Cyt1Aa dependía de una interacción física entre las proteínas [32]. Se observó que la incubación de vesículas derivadas de intestino del mosquito *Aedes aegypti* con Cyt1Aa incrementaba el número de sitios de interacción para la toxina Cry11Aa. También se vio que existen dos epítopes en Cyt1Aa de interacción entre las toxinas, uno ubicado entre  $\beta 6$  y  $\alpha E$  y otro ubicado en la  $\beta 7$ . Se buscó sobre Cry11Aa qué regiones contactaban a éstos epítopes de Cyt1Aa y se descubrió que la región de Cry11Aa es la misma involucrada en la interacción con uno de sus receptores de la membrana. Para validar esta interacción se construyeron mutantes en ambas proteínas en sus regiones de contacto y cuando se mezclaron estas mutantes se observó una reducción en unión y sinergia. Los datos permitieron concluir que Cyt1Aa funciona como un receptor adicional para la toxina Cry11Aa al unirse a membranas. Estudios posteriores mostraron que la interacción entre ambas toxinas favorece la oligomerización de Cry11A y que incrementaba su formación de poro, medido mediante conductividad en bicapas lipídicas [33]. De esta forma se tenía un mecanismo novedoso en que la bacteria producía no sólo las toxinas formadoras de poro sino una proteína que podía servir para anclarlas a la membrana blanco. Lo que aún se desconoce es si esta interacción es una particularidad de estas dos proteínas o podría un mecanismo más generalizado de Cyt1Aa. La figura 3.6 esquematiza la ubicación de los epítopes de

interacción de Cyt1Aa cuando ésta se encontrara en conformación de sombrilla en una membrana.



**Figura 3.6 Despliegue de Cyt1Aa en membrana.** Esquema de la inserción de Cyt1Aa de acuerdo modelo de sombrilla. Los epítopes de unión a Cry11Aa [32] se remarcan en rojo.

### 3.5 Papel de las asas del dominio II de toxinas Cry en unión a receptores

Para llevar a cabo su función las toxinas Cry requieren contactar a proteínas en las membranas de las células epiteliales intestinales. Estas proteínas actúan como receptores secuenciales que permiten localizar a la toxina a las células blanco y después le permiten realizar todos los cambios conformacionales necesarios para que las toxinas oligomericen y formen poros.

La mayoría de los estudios que se han realizado para estudiar la interacción de las toxinas Cry con los receptores en membrana se han realizado en vista de especies lepidópteras y las toxinas Cry que resultan tóxicas para esas especies como lo son Cry1Ab y Cry1Ca. Estos receptores incluyen una proteína tipo caderina, y proteínas ancladas por GPI como son la aminopeptidasa-N y la fosfatasa alcalina. Debido a la conservación de la estructura tridimensional de 3 dominios de las toxinas se propuso que podría existir una conservación del mecanismo de acción para las toxinas Cry para las cuáles las especies dípteras son sensibles. Esto se confirmó con en el descubrimiento de que en especies dípteras existen proteínas de la misma naturaleza que funcionaban como receptores funcionales de toxinas Cry. Por ejemplo, una caderina, una

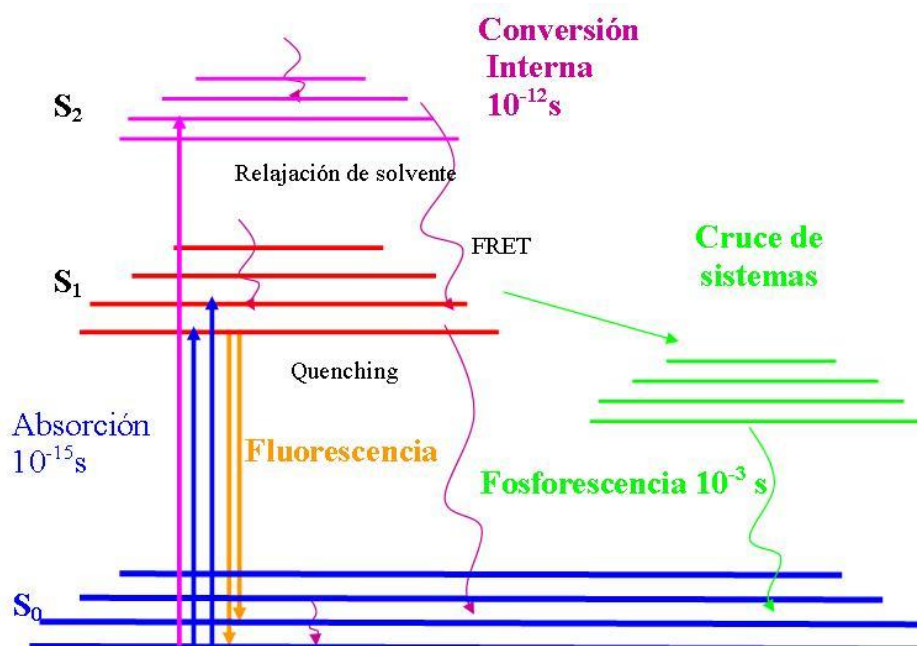
aminopeptidasa-N y una fosfatasa alcalina de *Aedes aegypti* fueron todas identificadas receptores de Cry11Aa a membranas de este insecto ([34], [35] y [13], respectivamente). En otros dípteros se han encontrado algunas de estas proteínas e incluso receptores novedosas como una  $\alpha$ -amilasa en *Anopheles albimanus* [36], también anclada por GPI y que actúa como receptor para Cry4Ba. Con esta evidencia se pudo suponer que el mecanismo de acción podría seguir los mismos pasos en lepidópteros y dípteros.

Por otra parte se sabe que las Cry tóxicas para lepidópteros contactan a sus receptores por medio de regiones discretas de los dominios II y III, principalmente por las asas expuestas [6]. Las estructuras cristalográficas de las diferentes toxinas Cry indican que las regiones más variables son las asas y que éstas podrían estar confiriendo la especificidad hacia el insecto blanco y que mutaciones en esas asas podrían abatir la función de la toxina. A diferencia de los estudios con toxinas Cry1, las regiones del dominio III de las toxinas Cry4 o de Cry11Aa involucradas en la unión con receptores han sido exploradas en menor grado [37]. En cambio, el dominio II de estas toxinas sí ha sido estudiado ampliamente. Por ejemplo, Abdullah observó que para Cry4Ba la introducción de mutaciones en el asa 1 y asa 3 del dominio II abatían la función de la toxina [38]. En ese mismo trabajo se introdujo en el asa 3 del dominio II de Cry4Ba al asa 3 del dominio II de Cry4Aa y esto volvió a la toxina activa contra mosquitos del orden *Culex* contra los cuáles normalmente no es tóxica. En otro estudio se observó que además del asa 2 y 3 las otras asas del dominio II de la toxina Cry4Ba están involucradas en su toxicidad ya que mutaciones en varias de ellas reducían la toxicidad contra *Aedes aegypti* [39]. Aunque las mutaciones puntuales en el asa 2 o 3 reducen su toxicidad es sólo hasta que se mutan ambas que se abate la función por completo [40]. Para Cry4Aa se observó que si se muta, reemplaza o reubica del asa 2 del dominio II se logra reducir o abatir la toxicidad de la proteína contra el mosquito *Culex pipiens* ([41], [42]). También se ha observado que el asa 2 de Cry4Aa es un poco más larga que la región correspondiente en Cry4Ba y que si se intenta acortar esta asa se reduce drásticamente la toxicidad [43]. En Cry11Aa se observó que el asa  $\alpha 8$  está involucrada en el contacto al receptor fosfatasa alcalina ya que la competencia con péptidos sintéticos de esa asa impedía su unión a esta proteína y a membranas intestinales y que además la mutación del asa  $\alpha 8$  reducía la toxicidad de esta proteína contra *Aedes*

*aegypti* [44]. De manera similar, mutantes en el asa  $\alpha 8$  de Cry4Ba reducen la unión a la fosfatasa alcalina (Reyes, E.Z., datos no publicados). Todo esto apunta a la importancia del asa 2, 3 y  $\alpha 8$  del dominio II de las toxinas Cry de *Bti* en la interacción con los receptores de los insectos blanco. El papel de Cyt1Aa como receptor de Cry11Aa también se ve reducido por mutaciones en el asa  $\alpha 8$ . El hecho de que entre las distintas toxinas se presenten regiones equivalentes para contactar con receptores sugiere que en las toxinas Cry4 el asa  $\alpha 8$  también puede jugar un papel importante en la interacción y sinergia con Cyt1Aa.

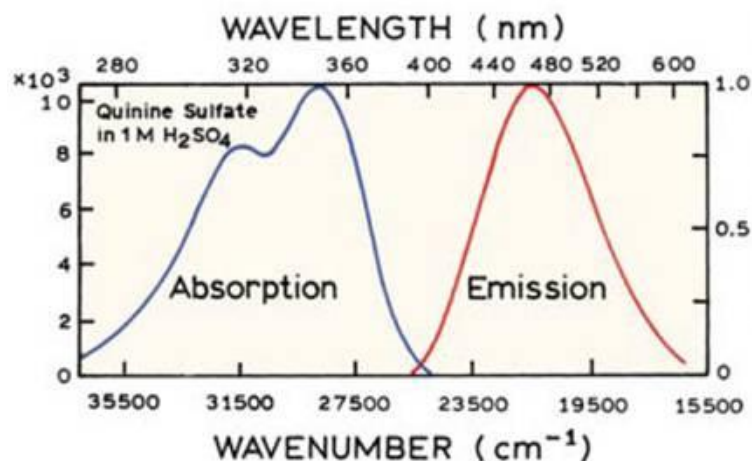
### **3.6 Principios de Fluorescencia para estudios biológicos**

Una herramienta utilizada ampliamente para estudiar procesos biológicos es la fluorescencia. La fluorescencia se basa en la propiedad de algunas moléculas con anillos aromáticos, llamadas fluoróforos, de reemitir la energía aportada por un fotón incidente con cierta longitud de onda como otro fotón de energía más baja y por lo tanto de longitud de onda más larga. Este pequeño principio y algunos otros efectos colaterales permiten estudiar de manera altamente sensible y específica desde la distribución de un compuesto en un tejido hasta la tasa de movimiento de un aminoácido durante un cambio conformacional en una proteína, por ejemplo. Los fluoróforos pueden ser los aminoácidos aromáticos propios de la proteína (triptófano, fenilalanina, tirosina) o moléculas fluorescentes unidas covalentemente a la proteína. Los fundamentos químicos de la fluorescencia se pueden explicar con el diagrama de Jablonski, mostrado en la figura 3.7.



**Figura 3.7 Diagrama de Jablonski para la fluorescencia.** El diagrama fue adaptado a partir de [45]

En el proceso de fluorescencia los electrones en los niveles vibracionales basales del fluoróforo son excitados por la absorción de un fotón incidente y llevados a niveles superiores de energía ( $S_1$  o  $S_2$ ). Desde este estado excitado se pierde energía por fenómenos no radiativos como la conversión interna (cambio a subniveles de excitación menores), transferencia de electrones, relajación del solvente, formación de complejos con otros compuestos, o liberación de calor, entre otros. Estos procesos son rápidos y ocurren en el orden de  $10^{-12}$  segundos. Los electrones excitados también pierden energía por fenómenos radiativos más lentos como son la fluorescencia ( $10^{-9}$  segundos) o la fosforescencia ( $10^{-3}$  segundos) donde se emiten fotones de menor longitud de onda debido a la pérdida de energía en el estado excitado por los fenómenos no radiativos, principalmente la conversión interna. El cambio en longitud de onda del fotón emitido comparado con el absorbido se conoce como corrimiento de Stokes. Debido a que una población de fluoróforos se encuentra en estados basales distintos (aunque con algunos favorecidos) tanto la absorción como la emisión se observan como espectros que abarcan diferentes longitudes de onda. Cada fluoróforo posee espectros de absorción y emisión característicos. Por ejemplo, la figura 3.8 corresponde a los espectros de absorción y emisión del sulfato de quinina [45].



**Figura 3.8** Espectro de absorción y emisión del sulfato de quinina. Figura tomada de [45]

Los fluoróforos también poseen propiedades particulares de sensibilidad a polaridad del solvente, eficiencia de reemisión de fotones e interacción con compuestos en el estado excitado, todas las cuales son parámetros estudiables y que pueden ser explotados para obtener información sobre una proteína. La sensibilidad al solvente depende de la interacción del dipolo del estado excitado con el dipolo de las moléculas del solvente. En un solvente con una alta constante dieléctrica el fluoróforo pierde energía cuando las moléculas del solvente se reorientan para acomodar al dipolo del estado excitado. En un ambiente menos polar la pérdida de energía es menor y por consiguiente menor el corrimiento de Stokes. El grado de sensibilidad depende de la magnitud del dipolo propio del fluoróforo. La eficiencia de retransmisión de fotones absorbidos a los emitidos se conoce como rendimiento cuántico y el máximo teórico es 1. Finalmente, un fluoróforo puede interactuar físicamente con otros compuestos que evitan su emisión de fotones. Estos compuestos se conocen como apagadores (o “quenchers”, en inglés) y pueden actuar sobre el fluoróforo evitando su excitación (apagamiento estático) o robando la energía del estado excitado (apagamiento colisional). La constante de Stern-Volmer es un valor que se relaciona con la tasa con la que un compuesto reduce la fluorescencia de un fluoróforo y se obtiene analizando la intensidad de emisión a diferentes concentraciones de un apagador.

### 3.7 Despliegue en fago M13

Una parte importante de la investigación de proteínas es estudiar la interacción que realizan con otras moléculas biológicas. Tradicionalmente, el estudio de interacciones de una proteína se ha realizado mediante la introducción de mutaciones en la secuencia



de aminoácidos y después evaluando su efecto. La tecnología de despliegue en fagos se desarrolló con miras a poder generar bancos grandes de péptidos y poder evaluar de manera simultánea el efecto de cada uno sobre las interacciones de una proteína. El sistema tiene la ventaja de acoplar físicamente al péptido con la secuencia de ADN que lo codifica además de eliminar la necesidad de procesar cada una de las clonas del banco de forma individual.

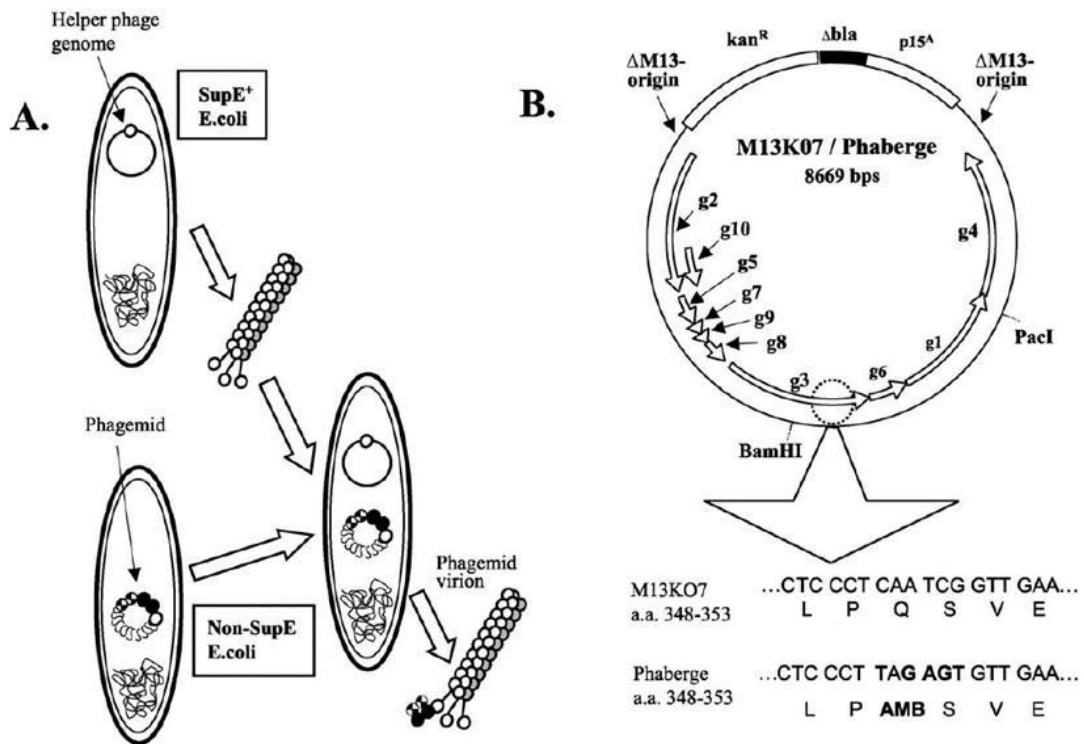
El fago M13 es un virus filamentosos que infecta a la bacteria *Escherichia coli* y se ha utilizado ampliamente como plataforma para la expresión de proteínas mutantes [46]. En este sistema se utiliza un fagémido, que es un vector recombinante y de expresión que incluye unas modificaciones del fago para introducir péptidos o proteínas en fusión a alguna proteína de la superficie del virus. Una bacteria es transformada introduciendo el fagémido que contiene la secuencia para la proteína fusión. Esta bacteria después es infectada con un fago silvestre (denominado ayudador). La infección induce la producción de la proteína fusión y la replicación del fagémido. Como producto de la infección se produce una progenie de fagos que durante su ensamblado incorporan a la proteína fusión y que contienen al fagémido. También habrá producción de fagos que no incluyan al fagémido, pero éstos son contra seleccionados con alguna resistencia codificada en el fagémido. De esta forma se asegura que exista una producción amplia de fagos cuya cápside presente copias de la proteína fusión. En general la fusión se realiza con la proteína P3 de M13 ya que sólo existen 5 copias de ella por cápside viral y esto reduce la posibilidad de alterar la función del virus o presentar un exceso de sitios de interacción.

Una vez que se tiene una producción de fagos con proteína fusión esta biblioteca es expuesta a algún sustrato inmovilizado contra el cual se quiere probar la unión del péptido desplegado, proceso conocido como “biopanning”. Los péptidos que interactúen serán retenidos sobre el sustrato y después pueden ser recuperados unidos al fago y al fagémido en su interior. Los fagos sin interacción son descartados. Por un proceso iterativo de biopanning uno puede enriquecer y eventualmente recuperar péptidos que muestran interacciones específicas. La secuenciación del fagémido revela la secuencia de dicho péptido.

Como toda técnica existen limitaciones. Una es el tamaño del péptido que se puede desplegar en fusión a la proteína del fago. Proteínas grandes resultan difíciles de desplegar en fagos. Se han evaluado diferentes sistemas para mejorar la traducción e incorporación de las proteínas fusión a la cápside viral basados en péptidos señal [47].

Otra limitante de la técnica es que la producción de fagos que no incorporen la proteína fusión compita con la producción de fagos de interés. Un bajo rendimiento de viriones fagémido puede limitar la recuperación de péptidos con unión específica. Para sobreponerse a esto se ha desarrollado un sistema con un fago ayudador modificado llamado Phaberge [48]. Este fago ayudador ha sido diseñado con un codón de paro ámbar en la proteína P3. Para su producción son propagados en cepas de bacterias supresoras del codón ámbar. Cuando se infecta una cepa no supresora, sólo las proteínas codificadas en el fagémido serán producidas ya que éstas no poseen el codón de paro. La figura 3.9 muestra un resumen del sistema Phaberge.

El uso eficiente del sistema de despliegue en fagos puede permitir no sólo la expresión de péptidos pequeños sino de proteínas completas, y así se puede generar un banco de mutantes de una proteína y tamizar dicha biblioteca en búsqueda de variantes que presenten características de interés.



**Figura 3.9 Descripción del sistema de despliegue de M13 Phaberge.** A. Utilización de un fago ayudador Phaberge producido en cepa de *E. coli* supresora para infectar una cepa no supresora con el fagémido de interés para producir fagos con proteínas fusión. B. Comparación del genoma del fago ayudador M13 K07 contra Phaberge mostrando la ubicación de los 10 genes y el cassette de resistencia. Se indica el codón ámbar introducido en el gen de la proteína 3 del fago.

[48]

#### 4. HIPÓTESIS

La hipótesis de este trabajo se centra en la especificidad de las interacciones de Cyt1Aa y sus efectos tóxicos y posee dos vertientes:

- 1) La especificidad de Cyt1Aa observada contra diferentes insectos *in vivo* se debe a una interacción diferencial con las membranas donde sólo las células epiteliales del intestino del insecto sensible (Ej. *Aedes aegypti*) son permisivas a la unión e inserción de la toxina activada y así al posterior efecto citolítico. Estas interacciones no se observan en las membranas de insectos no sensibles (Ej. *Manduca sexta*).
- 2) Cyt1Aa sinergiza la actividad de las toxinas Cry4 al funcionar como un receptor por medio de contactos en regiones específicas. Cry4Ba une a Cyt1Aa a través de las asas del dominio II que están involucradas en unión a receptor.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la especificidad de las interacciones que Cyt1Aa establece con la membrana de células epiteliales del intestino entre un insecto sensible y uno no sensible así como la especificidad de la interacción con las toxinas Cry4 de *Bt* y su efecto sobre la sinergia.

## 6. OBJETIVOS PARTICULARES

Para poder examinar la especificidad de las interacciones de Cyt1Aa con membranas y con proteínas Cry se buscará cumplir los siguientes objetivos:

- 1) Investigar la interacción de la toxina Cyt1Aa con las vesículas derivadas de membranas de células intestinales (VMMA) de *A. aegypti* y *M. sexta*, además de examinar si existen diferencias entre los organismos en otros pasos del mecanismo de acción propuesto para la toxina.
- 2) Determinar si es posible encontrar condiciones donde se pueda discriminar la interacción con VMMA de *Aedes aegypti* de la interacción con VMMA de *Manduca sexta* para el uso de despliegue de fagos.
- 3) Examinar si los epítopes de interacción de Cyt1Aa para sinergia son específicos para unir a Cry11Aa o si sus efectos de unión y toxicidad son compartidos con las otras toxinas de *Bti*.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Producción y recuperación de espora/cristal de toxinas

La cepa acristalífera 407 de *Bt* transformada con el plásmido pWF45 es crecida por un día a 30 °C en cajas de medio LB con Ampicilina 10 µg/ml. Después se hacen tres pases de la cepa en cajas con medio de esporulación HCT con Eritromicina 10 µg/ml. El último pase es usado para inocular cajas con medio HCT sólido con Eritromicina 10 µg/ml y se crece a 30 °C hasta esporulación (aprox. 72 hrs.). Para verificar esporulación del cultivo se observa una muestra en el microscopio óptico para detectar presencia de esporas y cristales de toxina y ausencia de células vegetativas. Los cultivos son recuperados en buffer de 3 M NaCl 0.5 M EDTA, pH 8.0, y centrifugados por 10 minutos a 10000 rpm a 4 °C. La pastilla recuperada es lavada 3 veces con 15 ml de un buffer de 3 M NaCl 0.5 M EDTA, pH 8.0, por medio de centrifugación a 10 000 rpm por 10 minutos a 4 °C en tubos Falcon de 50 ml. Después se lava 4 veces con 15 ml H<sub>2</sub>O MiliQ y PMSF 1 mM por centrifugación de igual forma a los lavados anteriores. Finalmente se resuspende la pastilla en 6 ml de buffer TTN (20 mM Tris, 300 mM NaCl, Tritón X-100 0.1%, pH 7.2) y se guarda a 4 °C hasta su purificación.

Los cristales de las toxinas Cry4 son producidos en un protocolo similar pero con la diferencia de ser crecidas en medio SP complementado con eritromicina 10 µg/ml. Las cepas de *Bt* que expresan las toxinas Cry4 son transformaciones de la cepa 4Q2-81, donde la que produce a Cry4Ba posee el plásmido pHT606 y aquella de Cry4Aa posee el plásmido pHT618.

### 7.2 Purificación de cristales de toxinas

Los cristales/espora son resuspendidos por vortex hasta deshacer grumos. Después se sonica la muestra 1 minuto 4 veces, separadas por un intervalo de 1 minuto en hielo. La muestra sonicada se lleva a 12 ml con buffer TTN. Esta muestra se reparte en 6 tubos con un gradiente discontinuo de sacarosa preparado de la siguiente forma:

84% = 33.6 g sacarosa + 12 ml H<sub>2</sub>O

79% = 31.6 g sacarosa + 14 ml H<sub>2</sub>O

72% = 28.8 g sacarosa + 17 ml H<sub>2</sub>O

67% = 26.8 g sacarosa + 19 ml H<sub>2</sub>O

Se funde la sacarosa por calentamiento. Una vez fría se complementa para obtener concentraciones finales de: Tritón X-100 al 0.01%, Tris-HCl pH 8.0 al 50 mM y NaCl a 10 mM. En cada tubo del gradiente se agregan 6 ml de cada concentración de sacarosa lentamente, empezando por 84% y terminando con 67% hasta arriba.

Los gradientes se centrifugan a 23000 rpm por 30 minutos a 15 °C en una ultracentrífuga Beckman con un rotor de ángulo libre. Se desecha la fase transparente superior y se recuperan las fracciones 1 y 2 (de color blanquecino) por separado. Se procede a lavar estas fracciones con H<sub>2</sub>O MiliQ con Tritón 100 al 0.01%. Se centrifuga a 10000 rpm por 10 minutos a 4 °C. La pastilla se resuspende en esta misma solución de Tritón y se repite el lavado al menos 3 veces más. Finalmente, los cristales purificados son resuspendidos en 1.5 ml de Tris 50 mM pH 8.0 y PMSF 1 mM, y se guardan a 4 °C hasta su uso.

### **7.3 Solubilización y activación de toxinas**

Para Cyt1Aa, los cristales purificados son centrifugados a 13200 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se descarta el sobrenadante. La pastilla es resuspendida en buffer de carbonatos 50 mM a pH 10.5 y se agrega DTT para una concentración final de 10 mM. Se incuba 1 hora a 37°C con ligera agitación. Se centrifuga a 13200 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se recupera el sobrenadante y se cuantifica por absorbancia de luz UV a  $\lambda=280$  nm en un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Rockford, EUA), utilizando la equivalencia de 1 unidad de absorbancia=1 mg/ml. Se agrega proteinasa K en una relación masa/masa de 1:100 (proteasa: protoxina) y se incuba a 30 °C por 120 minutos, con ligera agitación. Se agrega PMSF a una concentración final de 1 mM. Se centrifuga 13200 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se recupera el sobrenadante con la toxina activada.

Para las toxinas Cry4, éstas siguen un proceso similar. Son solubilizadas una hora en buffer de carbonatos 100 mM pH 10.5 con 0.2% de mercaptoetanol. Las toxinas solubilizadas son cuantificadas por el método de Bradford y activadas con tripsina por 16 horas a 37°C en una relación masa/masa de 1:20 (tripsina: toxina).

#### **7.4 Biotinación de Cyt1Aa activada**

La toxina Cyt1Aa activada es dializada toda la noche a 4 °C contra una solución de boratos pH 8.6 (ácido bórico 0.05 M, NaOH 0.05 M, NaCl 0.15 M), en una relación 1:1000 volumen/volumen (toxina: solución). La toxina es recuperada y cuantificada por absorbancia a 280 nm como previamente. Se agrega reactivo de biotinación (Amersham Biosciences, Suecia) en una relación de 20 µl de reactivo por cada 600 µg de proteína. Se incuba 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de biotina es eliminado por una columna de Sephadex G25 previamente lavada y equilibrada con buffer PBS. La muestra se agrega a la columna y es centrifugada por 2 minutos a 2000 rpm con aceleración y freno bajo en un centrífuga Eppendorf 5810 R, utilizando un rotor de ángulo libre.

Para verificar el marcaje de la proteína con biotina, se cargan 500 ng de proteína en un gel SDS-PAGE 15%. El gel es después transferido a una membrana PVDF (Millipore, EUA) activada con metanol. La membrana se bloquea 20 minutos con PBS-Tween 2%, se lava dos veces por 15 minutos con PBS-Tween 0.1%, después de incuba con estreptoavidina acoplada a peroxidasa 1:5000 en PBS-Tween 0.1% por 1 hora y finalmente se lava dos veces con PBS-Tween 0.1% y dos veces con PBS. Se revela la membrana con substrato quimioluminiscente SuperSignal (Pierce, EUA).

#### **7.5 Purificación de Cyt1Aa activada**

La toxina Cyt1Aa activada es separada de la proteinasa K por medio de una columna de intercambio iónico. Una columna de 500 µl de la resina DEAE de Toyopearl (Alemania) es lavada con 5 ml de de agua destilada y equilibrada con 5 ml de un buffer Tris 20 mM pH 7.5. Se hacen pasar soluciones de NaCl en Tris 20 mM pH 7.5 de la siguiente forma: 5 volúmenes (500 µl cada uno) sin NaCl, 2 volúmenes con NaCl 50mM, 2 volúmenes con NaCl 75mM, 2 volúmenes con NaCl 100 mM, 2 volúmenes con NaCl 150 mM, 2 volúmenes con NaCl 20 0mM y 2 volúmenes con NaCl 500 mM. Se recuperan fracciones de 250 ó 500 µl. El contenido proteico de las fracciones es analizado por absorbancia a 280 nm en un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, EUA). La columna es lavada con agua destilada y almacenada en etanol 20%.



## 7.6 Concentración de Cyt1Aa

Para intercambios de buffer y concentración de Cyt1Aa se utilizan tubos Amicon Ultra-4 NMWL 5000 (Millipore, EUA). Para reducir un volumen inicial de 4 ml, las muestras se centrifugan por 20 minutos a 15 °C a una velocidad de 7000g.

## 7.7 Marcaje fluorescente de toxina Cyt1Aa activada

Las muestras de Cyt1Aa purificada son incubadas con 1 mM DTT por 5 minutos antes de marcar para reducir cisteínas. Inmediatamente se elimina DTT por medio de una filtración en Amicon Ultra-4 con corte de 10 kDa, lavando con al menos 10 volúmenes de PBS desgasificado. Para marcaje de la toxina, se agrega un exceso molar de 50 veces de Alexa 350 de Molecular Probes (Invitrogen, EUA) disuelto en agua y se agrega 1 mM de EDTA como quelante de metales reductores. El volumen de la reacción (de 400 µl a 1 ml) se completa con PBS desgasificado. La reacción se incuba 2 horas a 37 °C en la oscuridad. Para eliminar el exceso de marca la toxina primero se dializa exhaustivamente contra buffer PBS (24 horas con 4 recambios, a 4 °C) y después se carga en una columna de Sephadex G25 equilibrada con 20 ml de PBS desgasificado. Se centrifuga por 2 minutos a 2000 rpm a 4 °C. La toxina marcada se recupera en el volumen eluido. Para verificar que la resina de la columna retenga fluoróforo libre ésta es iluminada con luz UV de  $\lambda=364$  nm. Para verificar eficiencia de marcaje se mide la absorbancia de luz UV por la toxina con  $\lambda=280$  nm y  $\lambda=346$  nm para Alexa 350. Para corregir la absorbancia de la toxina a 346 nm se determina un factor de la absorbancia intrínseca de Cyt1Aa de una muestra que no ha sido expuesta al fluoróforo con respecto a su absorbancia a 280 nm. Para cuantificar proteína se considera que una solución al 0.1% de Cyt1Aa tiene una absorbancia de 0.898, que sería equivalente a 1 g/l. Para determinar la estequiometría de marcaje se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{Abs(\lambda_{max}_{ex})}{\epsilon_{fluoróforo}} \times \frac{MW_{Cyt1Aa}}{mg/ml_{Cyt1Aa}} = \frac{moles_{fluoróforo}}{moles_{Cyt1Aa}}$$

## 7.8 Apagamiento de fluorescencia con KI

Todas las lecturas de fluorescencia fueron realizadas en un espectrofluorímetro AMINCO Bowman Series 2. Para experimentos de apagamiento se agrega KI a la muestra con toxina fluorescente en una curva desde 0 mM hasta 500 mM. Para

mantener la fuerza iónica constante se agrega KCl para completar a 500 mM. Para evitar la producción de I<sub>2</sub> de los iones yoduro se agrega Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en una concentración 8 mM en 250 µl de muestra de incubación. La lectura se realiza inmediatamente después de agregar el KI. Se utiliza una solución común de muestra con toxina fluorescente para cada punto de la curva buscando reducir variación.

<b>KCl 4M</b>	31.25 µl (500 mM)	28.125 µl (450 mM)	25 µl (400 mM)	15.625 µl (250 mM)	0 µl (0 mM)
<b>Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0.4M</b>	5 µl (8mM)	5 µl (8mM)	5 µl (8mM)	5 µl (8mM)	5 µl (8mM)
<b>Buffer de muestra</b>	13.75 µl	13.75 µl	13.75 µl	13.75 µl	13.75 µl
<b>Muestra</b>	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
<b>KI 4M</b>	0 µl (0 mM)	3.125 µl (50 mM)	6.25 µl (100 mM)	15.625 µl (250 mM)	31.25 µl (500 mM)

**Tabla 7.1 Condiciones experimentales para curva de apagado de fluorescencia con KI.**

Para experimentos de apagamiento se usa como control de las muestras de la curva una muestra equivalente con apagador pero sin toxina. Para estimar el porcentaje de apagamiento se calcula el valor  $F/F_0$ , donde F es la fluorescencia a cierta concentración de KI y  $F_0$  la fluorescencia en ausencia de KI. Estos valores se introducen en una regresión lineal para obtener una recta de apagamiento. La constante de Stern-Volmer corresponde a la pendiente de dicha regresión.

### **7.9 Ensayo de Hemólisis**

Para la preparación de eritrocitos frescos se extrae sangre humana y se transfiere inmediatamente a una solución Alsever's (Dextrosa anhidra 0.11M, cloruro de sodio 0.07 M, citrato de sodio 0.02 M, ácido cítrico 0.002 M). Para eliminar plasma sanguíneo y otros componentes de la sangre, ésta es resuspendida en solución Alsever's y centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos a 4 °C en una centrífuga Eppendorf 5810 R. Se retira el sobrenadante con cuidado y se resuspende suavemente la pastilla en solución Alsever's. Este proceso se repite hasta que el sobrenadante sea transparente.

Para calibrar la curva de hemólisis, se mezclan en un tubo Eppendorf 50  $\mu\text{l}$  de eritrocitos con 950  $\mu\text{l}$  de agua destilada para 100 % de lisis o 950  $\mu\text{l}$  de solución Alsever's para 0 % de lisis. Se agita suavemente y se centrifuga 5 minutos a 2500 rpm a 4 °C. Se recupera el sobrenadante con cuidado y se lee su absorbancia en  $\lambda = 405 \text{ nm}$ . Los eritrocitos deberán ser concentrados por centrifugación o diluidos con solución Alsever's hasta que la lectura del 100 % de lisis sea entre 1.0 y 1.1 y la lectura de 0 % sea menor a 0.1. Los eritrocitos pueden ser almacenados hasta un mes a 4 °C, siempre y cuando no tengan agitación y se resuspendan aproximadamente cada dos días por medio de rotación lenta del contenedor.

Para detectar hemólisis por Cyt1Aa se agregan 20  $\mu\text{l}$  de eritrocitos en 180  $\mu\text{l}$  de mezcla toxina/Alsever's en un pozo de una placa de 96 pozos con fondo plano. Se incuba 30 minutos a 37 °C sin agitación. La placa es centrifugada 5 minutos a 2500 rpm a 4 °C y el sobrenadante transferido a un pozo limpio. El porcentaje de hemólisis se determina por la lectura en  $\lambda = 405 \text{ nm}$  en un lector de placas de ELISA (Molecular Devices, EUA) y comparada con controles de 100 % y 0 % de lisis.

### **7.10 Disección de larvas**

Para obtener una cantidad razonable de intestinos de mosquito se disectan 1500 larvas de 4<sup>to</sup> instar de *Aedes aegypti*. Se remueve la cabeza, papilas anales y la cutícula de la larva y se extrae el intestino. Los intestinos recuperados son vaciados de comida y separados de los tubos de Malpigio. Se guardan en buffer MET (Manitol 300 mM, EGTA 5 mM, Tris HCL 17 mM) frío con PMSF 1 mM y DTT 5 mM y se almacenan a -70 °C.

Se disectan 100 larvas de 3<sup>er</sup> instar de *Manduca sexta*. Con pinzas y tijeras de disección se abre la cutícula desde el segmento 3 hasta el segmento 9. Con las tijeras se cortan los extremos del intestino expuesto entre estos segmentos. Se retira el alimento del intestino lavando en agua bidestilada y se guarda en buffer MET frío con PMSF 1 mM y DTT 5 mM. Se almacenan a -70 °C en un volumen no mayor a 3 ml.

### **7.11 Preparación de vesículas de microvellosidad apical (VMMA) de *Aedes aegypti* y *Manduca sexta***

Los intestinos de *Aedes aegypti* se resuspenden en 5 ml de buffer MET frío PMSF 1 mM y DTT 5 mM (buffer A). Con un homogenizador de tejidos estéril se trituran los intestinos 8 veces a 2250 rpm, lentamente. Se agregan 4.5 ml del buffer A y 500  $\mu$ l de  $MgCl_2$  240 mM (final 12 mM  $MgCl_2$ ). Se mezcla con vortex y se deja en hielo 20 min. Después se centrifuga a 3000g por 15 minutos a 4 °C. Se recupera el sobrenadante. La pastilla se resuspende en 5 ml de buffer A y se homogeniza como la vez anterior. Se agregan 4.5 ml de buffer A y 500  $\mu$ l de  $MgCl_2$  240 mM. Se pasa por vortex y se deja reposar 15 minutos en hielo. Después se centrifuga a 2000g por 15 minutos a 4° C. Se recupera el segundo sobrenadante y se junta con el primero. La pastilla se vuelve a homogenizar y se centrifuga una tercera vez como en el paso anterior. El tercer sobrenadante se junta con los otros dos. Los sobrenadantes se centrifugan a 100000g por 10 minutos a 4° C. Se descarta el sobrenadante. La pastilla se resuspende en buffer A, se preparan alícuotas y se almacenan a -70 °C.

Los intestinos de *Manduca sexta* se descongelan y 3 gramos de tejido se resuspenden en proporción 1:10 peso: volumen con buffer A frío. Con un homogenizador estéril se trituran los intestinos 9 veces a 2250 rpm, lentamente. Se agrega un volumen igual de  $MgCl_2$  240 mM. Se agita suavemente y se deja en hielo 15 minutos. Se centrifuga a 2500g durante 15 minutos a 4 °C. Se descarta la pastilla y se cambia el sobrenadante a un tubo estéril. Se centrifuga a 30000g durante 30 minutos a 4 °C. Se descarta el sobrenadante. Se resuspende la pastilla en ½ volumen de buffer A y ½ volumen  $MgCl_2$  240 mM. Se repiten las centrifugaciones. La pastilla obtenida esta segunda vez se resuspende en 1 ml de buffer A. Se homogeniza tres veces. Se preparan alícuotas y se almacenan a -70° C.

Las vesículas así preparadas se cuantifican por el método de Lowry (Bio-Rad, EUA) para determinar la proteína total en las membranas.

### **7.12 Preparación de liposomas**

Todos los lípidos utilizados son de Avanti Polar (Alabaster, Alabama, EUA). Para la preparación de 1.3 ml de liposomas se utilizan 1.3  $\mu$ mol totales de lípido en una relación 30:3:1 de fosfatidilcolina, colesterol y estearilamina, estos dos últimos disueltos en una

solución 1:2 cloroformo: metanol. Los lípidos se esparcen por rotación sobre la superficie interna de un tubo de ensayo lavado con cloroformo procurando la formación de una película lipídica adherida a la pared de vidrio mediante la evaporación lenta del solvente, aplicando una suave corriente de nitrógeno en el fondo del matraz. Posteriormente, para eliminar por completo el solvente en condiciones no oxidativas, la película lipídica se seca al vacío durante 12 horas en un Speed Vac SVC100 (Savant, EUA).

Los lípidos se hidratan agregando 1.3 ml de Buffer CHES 10 mM, KCl 150 mM, pH 9, y dejando incubar durante 5-10 minutos, moviendo suavemente el tubo, después de lo cual se elimina el oxígeno del tubo aplicando una corriente de nitrógeno (aprox. 10 minutos) y se tapa. La mezcla se pasa 2 veces brevemente por vortex hasta obtener una solución homogénea de vesículas multilaminares.

Para formar las SUVs (vesículas unilaminares pequeñas), la mezcla anterior se sonica dando pulsos de 1 minuto en un sonicador de agua Branson 1200 (Branson, EUA), con intervalos de 1 minuto entre cada pulso manteniendo la mezcla a 4 °C. Esto se hace hasta obtener una solución semi-translúcida (aproximadamente 3 pulsos). Los liposomas se guardan a 4 °C por un máximo de 3 días.

### **7.13 Western Blot para Cyt1Aa**

La proteína Cyt1Aa se observa por medio de Western Blot. La muestra se resuelve en un gel de SDS-PAGE 15 %. El gel se corre y se transfiere a membranas de PVDF (Millipore, EUA) previamente activadas con metanol por 5 minutos. La membrana es bloqueada por 1 hora a temperatura ambiente con 5 % de leche en PBS-Tween 20 al 0.1 %. Se realizan 5 lavados rápidos con agua bidestilada, seguidos de dos lavados de 5 minutos con PBS-Tween 20 0.1%. Se cuenta con anticuerpos monoclonales y policlonales contra Cyt1Aa. Se incuban 1 hora a temperatura ambiente con un dilución 1:50000 del anticuerpo anti-Cyt1Aa ID5 (monoclonal, en ratón) o 1:70000 del anticuerpo Rb 11-3 (policlonal, en conejo), ambas en PBS-Tween 20 0.1%. Se lava la membrana como la vez anterior. Para detectar los anticuerpos contra Cyt1Aa se incuba 1 hora a temperatura ambiente con anti-ratón-peroxidasa o anti-conejo-peroxidasa, ambos 1:10000 en PBS-Tween 0.1%. Se lava la membrana como en pasos anteriores.

Se hacen dos lavados adicionales de 5 minutos con PBS 1X. La membrana es incubada 1 minuto con Se revela membrana con substrato quimioluminiscente SuperSignal (Pierce, EUA).

#### **7.14 Tratamiento con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en VMMA**

Para probar la unión a VMMA se incuban vesículas con la toxina y PBS-Tween 0.05% en un volumen final de 100 µl. Se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Se centrifuga a 13200 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se retira con cuidado el sobrenadante. Para lavar se resuspende pastilla en 100 µl de PBS-Tween 20 0.05% frío y se centrifuga a 13200 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se tira el sobrenadante y se repite el lavado. Después se resuspende la pastilla en 100 µl de una solución fría de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM Manitol 300 mM (para equilibrar con la solución al interior de las VMMA). Se incuba por 30 minutos en hielo. Se centrifuga a 13200 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se descarta el sobrenadante y se lava dos veces con PBS-Tween 20 0.05% frío como las veces anteriores. Después de la última centrifugación se retira todo el sobrenadante.

#### **7.15 Ensayo competitivo en placa**

Este ensayo es adaptado de las pruebas de ELISA competitivo detalladas por Dong [49] y Hardy [50]. Para saturar los pozos de una placa de 96 pozos MaxiSorp (NUNC, Dinamarca) se incuba con 100 µl de una solución 10 µg/ml de proteína en NaHCO<sub>3</sub> 50 mM pH 9.6 toda la noche a 4 °C. Los pozos son lavados 3 veces con PBS 1X y se bloquea con 200 µl leche descremada al 2% en PBS 1X por 2 horas a 37 °C. Los pozos son lavados entre 3 a 5 veces con 100 µl de PBS-Tween 0.1%, hasta que se eliminen los restos visibles de leche.

Por otro lado se incuban 2 µg de VMMA con toxina biotinada por 30 minutos a 25 °C en un volumen de 100 µl. Después, las muestras son transferidas a un pozo en la placa de 96 pozos y se incuba 5 minutos a 37 °C. Se lavan los pozos 3 veces con PBS-Tween 0.1% y se incuban con 100 µl de estreptoavidina 1:5000 en PBS-Tween 0.1% por 1 hora a 37 °C. Los pozos son lavados 3 veces con PBS-Tween 0.1%. Se agregan 100 µl del sustrato colorante preparado de la siguiente forma: buffer de fosfatos 100 mM pH 5.6, 5 µl peróxido de hidrógeno 30% y 4 mg de ortofenilendiamina. Se deja incubar a

temperatura ambiente hasta tener señal de color y se agregan 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M. La placa se lee en un lector Emax (Molecular Devices, EUA) registrando la absorbancia a  $\lambda=490\text{nm}$ .

### **7.16 Propagación de fagos**

Se inoculan 3 ml de medio 2xTY con Tetraciclina 20  $\mu\text{g/ml}$  con una colonia de la cepa de *E. coli* XL1-Blue y se incuba toda la noche a 37 °C con agitación. Al siguiente día se inoculan 10 ml de 2xTY Tetraciclina 20  $\mu\text{g/ml}$  con 500  $\mu\text{l}$  del pre-cultivo y se incuba a 37° C con agitación hasta alcanzar un O.D. = 0.6 a 600 nm. Se adiciona una proporción 1:20 (bacterias: fagos) de fago ayudador Phaberge. Se incuba 45 minutos a 37° C sin agitación y después 45 minutos a 37 °C con agitación. Se centrifuga el cultivo a 4000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se retira sobrenadante y se resuspenden células en 1 ml de 2xTY/Tetraciclina 20  $\mu\text{g/ml}$  y Kanamicina 20  $\mu\text{g/ml}$  y se trasfiere a un matraz con 50 ml de 2xTY/Tetraciclina 20  $\mu\text{g/ml}$  y Kanamicina 20  $\mu\text{g/ml}$ . Se incuba 16 horas a 30 °C a 250 rpm.

Para la propagación de fagos desplegando la proteína fusión a P3 de M13 el proceso es idéntico excepto que los medios de cultivo se inoculan con la cepa de *E. Coli* HB2151 transformada con el fagémido pDSB que contiene a la fusión con la protoxina de Cyt1Aa (M1 a L249) o la forma activada de Cyt1Aa (E32 a S234). En vez de utilizar Tetraciclina se utiliza Ampicilina 100  $\mu\text{g/ml}$  para seleccionar las bacterias o fagos con este fagémido.

Para precipitar los fagos primero se centrifuga el cultivo a 5000 rpm por 10 minutos a 4 °C en un Falcon 50 ml. Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo. Se centrifuga a 8000 rpm por 10 minutos a 4 °C para eliminar restos celulares. Se recupera el sobrenadante y se agrega 1/5 de volumen de PEG 20 % NaCl 2.5 M. Se incuba toda la noche a 4 °C. Se centrifuga a 8000 rpm por 40 minutos a 4° C. Se retira sobrenadante. Se resuspende la pastilla en PBS 1X (30 % de volumen de PEG inicial). Se agrega PEG 20% NaCl 2.5M (15% de volumen total obtenido) y se incuba 4 horas a 4 °C. Se centrifuga a 8000 rpm por 40 minutos a 4 °C. Se descarta el sobrenadante. Se resuspende la pastilla en aproximadamente 1-2 ml de PBS 1X, de acuerdo a la viscosidad observada. Se filtra en 0.42  $\mu\text{m}$ . Se almacenan los fagos a -20 °C.

### **7.17 Cálculo de título de fagos**

Para calcular el título viral de los fagos desplegando la fusión primero se crece un cultivo de XL1-Blue en 10 ml de 2xTY con Tetraciclina 20 µg/ml. Se espera a que el cultivo llegue a O.D. 0.6 a 600 nm.

Se preparan diluciones seriales de los viriones fagémido (fagos con proteína desplegada) en un volumen final de 1 ml de 2xTY. Con 10 µl de esta dilución se infectan 990 µl de XL1-Blue O.D. 0.6. Se incuban los cultivos 30 minutos a 37 °C sin agitación. Se plaquean tres gotas de 10 µl de las muestras con factores de dilución  $10^4$ ,  $10^6$ ,  $10^8$ , y  $10^{10}$  y  $10^{12}$  en un caja con LB Ampicilina 100 µg/ml. Se incuba toda la noche a 37 °C.

Se cuenta el número de colonias en cada una de las gotas de una dilución dada y se obtiene el promedio. Para calcular el título viral por ml se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{(\# \text{ de colonias promedio})(\text{factor de dilución})}{\text{Volumen de infección}} = \text{cfu/ml}$$

Donde volumen de infección= 0.01 ml

### **7.18 Unión de fagos a VMMA y tratamiento con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**

La unión de viriones fagémido a VMMA se realiza como la incubación con Cyt1Aa con algunas modificaciones. Para la incubación se agregan  $10^5$  cfu en la reacción en un volumen final de 100 µl y se agrega 2 mM de PMSF. Se incuba durante 1 hora. Después se incuban 2 minutos a 30 °C. El resto del protocolo se sigue como anteriormente descrito.

Con 500 µl de un pre-cultivo de XL1-Blue en LB Tetraciclina 20 µg/ml se inoculan 10 ml de medio 2xTY Tetraciclina 20 µg/ml. Cuando el cultivo llegue a O.D. 0.6 a 600 nm se usan 300 µl para resuspender las muestras de VMMA/fago. Se incuban 30 minutos a 37 °C sin agitación. Después se toman todas las células y se plaquean en una caja con



LB Ampicilina 100 µg/ml. La caja se incubaba toda la noche a 37 °C. Finalmente se contabiliza el número de colonias que crecieron en la caja para determinar el número de fagos que se retuvieron en las vesículas.

### 7.19 Bioensayos con *Aedes aegypti* y sinergismo

Para probar la toxicidad de las preparaciones de espora-cristal de las toxinas de *Bti* se alimentan larvas de 4to instar de *Aedes aegypti*. Brevemente, en vasos de plástico con 100 ml de agua se colocan 10 larvas. Las preparaciones de espora-cristal se cuantifican por método de Bradford con BSA como referencia (Bio-Rad, EUA). Cada concentración de toxina se evalúa por triplicado. Para Cyt1Aa y sus mutantes se analizaron concentraciones de 6.25 ng/ml hasta 3200 ng/ml. Para las toxinas Cry4Aa y Cry4Ba y mutantes se evaluaron concentraciones de 5 a 2560 ng/ml. En ensayos de sinergia se usaron relaciones 1:4 de Cyt: Cry en la concentración de toxina total y se evaluaron concentraciones de 0.1 a 100 ng/ml para Cry4Ba y de 10 a 600 ng/ml con Cry4Aa. Después de 24 horas se cuenta el número de larvas muertas y se determina la LC<sub>50</sub> (dosis letal para el 50% de las larvas) por medio de análisis de Probit con el programa POLO-PC de LeOra Software [51].

La toxicidad teórica esperada para un ensayo de combinación de toxinas considerando un efecto aditivo es determinada mediante una media armónica como fue descrito por Tabashnik [52]. La fórmula es:

$$LC_{50}(Cyt + Cry) = \left( \frac{rCyt}{LC_{50}[Cyt]} + \frac{rCry}{LC_{50}[Cry]} \right)^{-1}$$

Donde rCyt y rCry representan la proporción de toxina usada en la mezcla y LC<sub>50</sub>[Cyt] y LC<sub>50</sub>[Cry] representan la LC<sub>50</sub> obtenida individualmente para la toxina Cyt1Aa o sus mutantes o Cry4 y sus mutantes, respectivamente. El factor de sinergia SF se obtiene dividiendo la LC<sub>50</sub> teórica esperada entre la LC<sub>50</sub> obtenida experimentalmente en los bioensayos con mezcla de toxinas. Un valor mayor a 1 indica sinergia y un valor menor a 1 indica antagonismo. El valor de 1 indica que el efecto es simplemente aditivo.

### 7.20 Ensayos de unión por ELISA

Las placas de ELISA (NUNC, Dinamarca) se incuban 12 horas a 4 °C por pozo con 250 ng de Cyt1Aa en NaHCO<sub>3</sub> 50 mM pH 9.6. La placa se lava 5 veces con PBS. Los pozos

se bloquean incubando con leche descremada 2% en PBS por 2 horas a 37 °C, después de lo cual se lava 5 veces con PBS-Tween 0.1%. Los pozos se incuban con diferentes concentraciones de Cry4Ba o sus mutantes por 2 horas a 37 °C y después son lavados 3 veces con PBS-Tween 0.1%. Las toxinas Cry4Ba unidas a Cyt1Aa se detectan incubando con un anticuerpo anti-Cry4Ba 1:10000 en PBS-Tween 0.1% por 2 horas a 37 °C. Los pozos se lavan como anteriormente y se incuban 1 hora a 37 °C con un anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa 1:10000 en PBS-Tween 0.1%. Se lavan los pozos y la señal es revelada con buffer de fosfatos 100 mM pH 5.6, 5 µl peróxido de hidrógeno 30% y 4 mg de ortofenilendiamina. Se deja incubar a temperatura ambiente hasta tener señal de color y se agregan 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. La placa se lee en un lector Emax (Molecular Devices, EUA) registrando la absorbancia a  $\lambda=490\text{nm}$ .

### **7.21 Ensayos tipo Ligand-Blot**

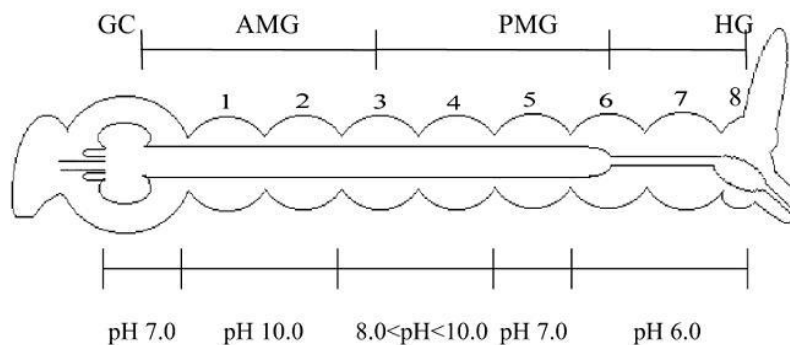
En un gel de SDS-PAGE 10% se resuelven 3 µg de Cry4Ba o sus mutantes y después son transferidas a membranas PVDF (Millipore, EUA). La membrana es bloqueada con 5% de leche descremada en PBS-Tween 0.1% por 1 hora. La membrana es después lavada 2 veces por 5 minutos con PBS-Tween 0.1%. La membrana se incuba 2 horas con 5 nM de Cyt1Aa silvestre en PBS-Tween 0.1%. La proteína unida se detecta incubando con anticuerpo anti-Cyt 1:70000 en PBS-Tween 0.1% 2 horas a 37 °C. Se lava la membrana y se incuba con por una hora con anticuerpo anti-conejo-peroxidasa 1:10000 en PBS-Tween 0.1%. Se revela membrana con substrato quimioluminiscente SuperSignal (Pierce, EUA).

## 8. RESULTADOS

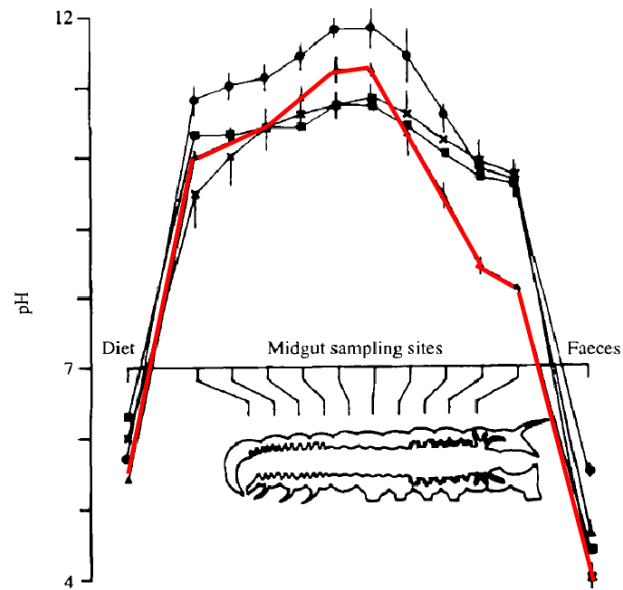
### I: Especificidad en la toxicidad de Cyt1Aa

#### 8.1 Solubilización de Cyt1Aa

Un primer punto donde podría existir una diferencia entre los insectos sensibles y los insectos no sensibles a la toxina es en la liberación desde el cristal dentro del organismo. La solubilización depende del pH del intestino y de su carácter reductor. En una revisión de la literatura se encontraron dos trabajos previos que caracterizan el pH a lo largo del intestino tanto de *Aedes aegypti* [53] como de *Manduca sexta* [54] y otros lepidópteros. Las figuras 8.1 y 8.2, tomadas de [53] y [54] respectivamente, muestran que el intestino anterior y medio de los insectos estudiados presentan pH superiores a 8.0 y llegan hasta pH 10.0. Es razonable esperar que el cristal de Cyt1Aa, en presencia de los agentes reductores presentes en ambos intestinos, se disocie en los monómeros de protoxina. Como fue descrito en Métodos, Cyt1Aa se solubiliza en el laboratorio con una solución amortiguadora de carbonatos a pH 10.5. La similitud de ambientes intestinales se traduce a que en el laboratorio esta misma solución pueda ser usada para la solubilización en laboratorio de toxinas Cry tóxicas para lepidópteros y dípteros (como Cry1Ab y Cry4Ba, por ejemplo).

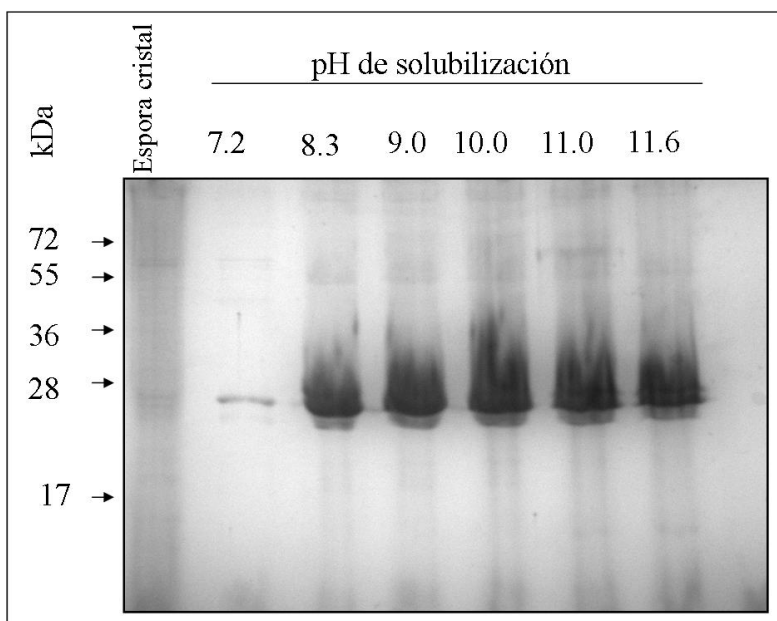


**Figura 8.1 Mediciones de pH intestinal de *Aedes aegypti*.** Las regiones del intestino se denotan de la siguiente forma: GC, caeca, AMG, intestino medio anterior, PMG, intestino medio posterior, HG: intestino posterior [53]



**Figura 8.2 Mediciones de pH intestinal de lepidópteros.** *Manduca sexta* es representada con la línea roja marcada con triángulos. Los otros lepidópteros del estudio son: cuadrados, *Lichnoptera felina*, cruces, *Lasiocampa quercus callunae*, círculos, *Acherontia atropos* [54]

Esto se comprobó experimentalmente. Se tomaron 2  $\mu\text{g}$  de cristales Cyt1Aa y se incubaron por 1 hora a 37 °C con buffers de diferente pH: 7.2, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 y 11.6. Después se centrifugaron las muestras y se recuperó el sobrenadante. Las muestras fueron separadas en un gel SDS-PAGE de 15% y teñidas con Coomassie. La figura 8.3 muestra que en todos los valores de pH probados es posible obtener proteína soluble, aunque a pH 7.2 el rendimiento es menor. Esto está en concordancia con las observaciones que hizo Escobar [55] al cuantificar la toxina Cyt1Ab1 en diferentes pH de solubilización, y aquí observamos por tinción que la banda de proteína obtenida es del tamaño esperado y abundante (cerca de 25 kDa). Con esta información podemos concluir que es altamente probable que el cristal de Cyt1Aa se puede solubilizar en el intestino de *Manduca sexta* de la forma que lo hace en el intestino de *Aedes aegypti* y que este paso no sea el definitorio de la especificidad de la toxina.

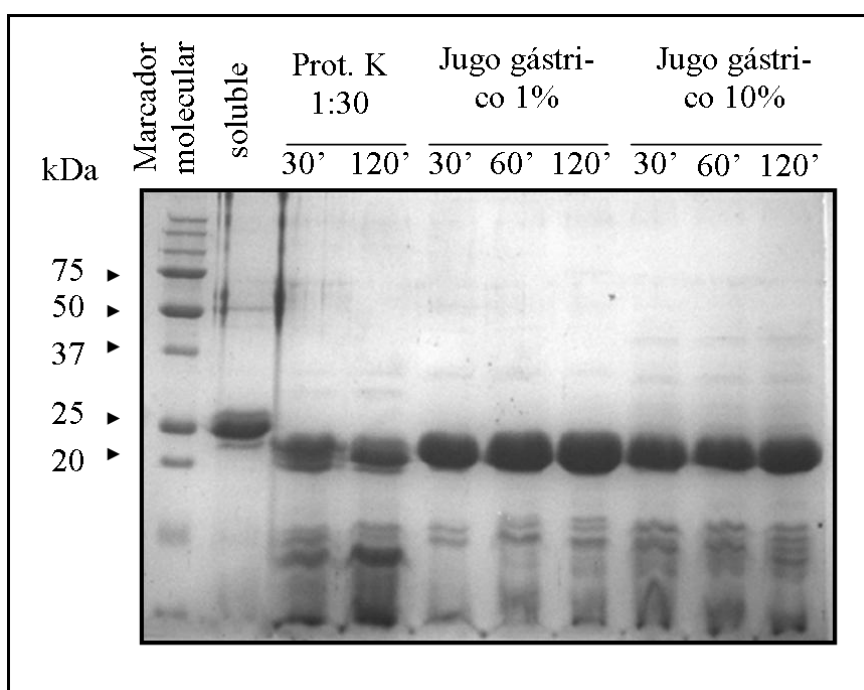


**Figura 8.3 Cyt1Aa solubilizada en diferente pH.** Todos los buffers son a base de carbonatos, excepto el valor de 7.2 realizado en buffer de fosfatos (PBS).

## 8.2 Activación y oligomerización

El procesamiento proteolítico de la toxina Cyt1Aa podría ser un punto probable de diferencia entre *Aedes aegypti* y *Manduca sexta* ya que el insecto no sensible tendría alguna enzima proteolítica en el intestino que degradara la protoxina o que no se procesara en los mismos sitios de tal forma que nunca hubiera toxina activada que llegara a las células intestinales. Para determinar cómo se activa la toxina Cyt1Aa en el ambiente intestinal, se extrajo jugo gástrico de larvas de 5to instar de *Manduca sexta*. Debido al pequeño tamaño de las larvas de *Aedes aegypti* y la dificultad de extraer el jugo gástrico se utilizó proteinasa K para la comparación ya que esta enzima se usa rutinariamente para la activación de Cyt1Aa en el laboratorio y se sabe que el fragmento resultante es activo (por ejemplo, ver [33]). Se probaron tiempos cortos y largos de activación para determinar si la activación era estable o eventualmente había degradación de la toxina, además de probar concentraciones diferentes de jugo gástrico para la activación (10% y 1% del volumen de protoxina utilizada). Las activaciones resultantes fueron verificadas mediante tinción con Coomassie en un gel SDS-PAGE de 15%.

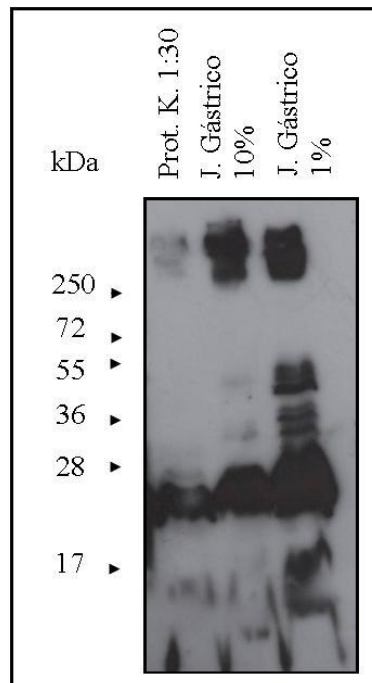
La figura 8.4 indica los resultados de estos experimentos. Se puede observar que el tamaño del fragmento liberado para todas las activaciones es similar teniendo un tamaño de aproximadamente 23 kDa en la banda más gruesa. Las activaciones con jugo gástrico muestran un patrón de péptidos pequeños distinto de las activaciones con proteinasa K lo cual sugeriría que aunque la talla de la banda mayoritaria de las activaciones con jugo gástrico de *M. sexta* es la esperada para la toxina Cyt1Aa activada podría ser que existiera un procesamiento diferente que llevara a una forma no funcional. También es posible que estos fragmentos provengan de procesamiento de otras proteínas presentes en el jugo gástrico.



**Figura 8.4 Activación de Cyt1Aa con diferentes proteasas.** El jugo gástrico es de larvas de 5<sup>to</sup> instar de *Manduca sexta*.

Un parámetro para observar la funcionalidad de la toxina es su capacidad de formar un oligómero. El trabajo de Rodríguez [56] en el laboratorio ha permitido establecer condiciones para obtener un oligómero de Cyt1Aa durante la activación. Este protocolo de activación proteolítica y oligomerización requiere de la presencia de algún tipo de membrana, por ejemplo liposomas sintéticos [56]. Se prepararon liposomas de una mezcla de fosfatidilcolina:colesterol:estearilamina en proporción 10:3:1 respectivamente, como se han utilizado en [24] y [33]. Utilizando las concentraciones de proteinasa K o de jugo gástrico probadas previamente se activaron 2  $\mu$ g de protoxina soluble en presencia de 30  $\mu$ l de liposomas de mezcla de lípidos (equivalente a 19.2  $\mu$ g

de lípidos) durante una hora a 37 °C. Las reacciones fueron detenidas con 5 mM PMSF. Se resolvieron las muestras en gel SDS-PAGE de 15% y se transfirieron a membrana de PVDF por 16 horas a 4 °C. Se verificaron por medio de Western Blot con un anticuerpo policlonal contra Cyt1Aa (gentilmente donado por el Dr. Sarjeet Gill, U. California, Riverside). La figura 8.5 muestra este Western Blot. Como se puede observar, los tres tipos de activaciones producen un banda de más de 250 kDa, un aglomerado tan grande que no puede penetrar en el gel separador de 15% acrilamida, reteniéndose cerca del fondo del pozo de cargado. La menor intensidad de la banda observada para la activación por proteinasa K podría deberse a una mayor degradación por esta proteasa, ya que incluso la banda de la toxina activada es de menor intensidad.



**Figura 8.5 Oligomerización de Cyt1Aa durante activación en presencia de liposomas.** El jugo gástrico es de larvas de 5<sup>to</sup> instar de *Manduca sexta*.

Se ha propuesto que el aglomerado grande corresponde al oligómero de Cyt1Aa, y se observa también durante la activación en presencia de membranas con la volvatoxina del hongo *Volvaricea volvacea* [57], una proteína estructuralmente homóloga a las toxinas Cyt. Este resultado nos sugiere que la forma procesada de Cyt1Aa observada en presencia de jugo gástrico de *M. sexta* es funcional ya que es capaz de formar un oligómero en membranas sintéticas. Este paso, entonces, no es aquél donde radica la especificidad de Cyt1Aa en insectos sensibles contra no sensibles, al menos en el caso de *M. sexta*. Es probable que las bandas adicionales observadas con jugo gástrico al 1%

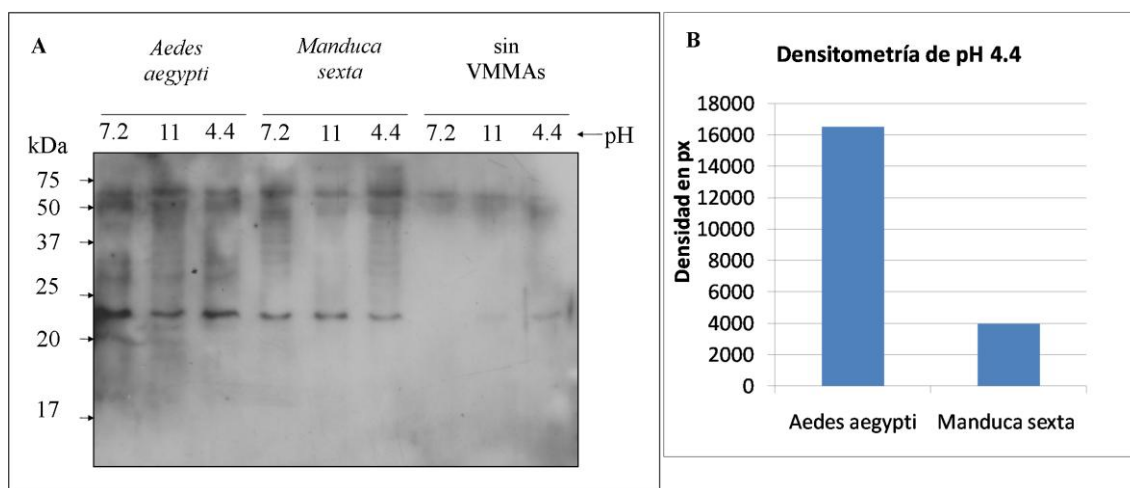
se deban a una degradación incompleta de agregados dada la menor cantidad de proteasa.

### **8.3 Unión de Cyt1Aa a membranas**

Se buscó probar si la especificidad radica en el tipo de interacción que la toxina tiene con las membranas intestinales. Para esto se extrajeron intestinos de larvas tanto de *Aedes aegypti* y *Manduca sexta* y se procesaron para derivar vesículas de la membrana de la microvellosidad apical (VMMA). Para poder rastrear a Cyt1Aa durante estos experimentos de incubación se biotinó la toxina activada.

La sensibilidad de un insecto ante una toxina Cyt depende de si puede unirse a las membranas blancos, donde debiera insertarse para lisar la célula. Es razonable pensar que una diferencia en la composición de las membranas entre *Aedes aegypti* y *Manduca sexta* impidiera el reconocimiento de la membrana blanco e hiciera a esta última insensible a la toxina. El primer contacto con la membrana debería ser de naturaleza electrostática y después ya en cercanía actuarían otras interacciones no dependientes de carga. Abe, Shimada y Kitada describieron un método para eliminar interacciones electrostáticas inespecíficas al estudiar a otra toxina producida por *Bt* denominada parasporina-2 [58]. El método consiste en lavar las membranas con una solución 100 mM de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y recuperar las proteínas que se mantienen unidas a la membrana por medio de centrifugación. Dado que la toxina Cyt1Aa naturalmente actúa en ambientes alcalinos se decidió también lavar a un pH ácido cercano al punto isoeléctrico calculado para la toxina buscando eliminar así otras interacciones electrostáticas.





**Figura 8.6 Incubación de Cyt1Aa con VMMA en diferente pH.** A) Incubación con VMMA y PBS-Tween 0.05% y posterior lavado con buffer de diferente pH (ver Métodos). B) Densitometría realizada sobre las bandas de los carriles a pH 4.4 y restando precipitación.

La figura 8.6 muestra los resultados de estas incubaciones. Las muestras fueron resueltas en un gel SDS-PAGE 15% y transferidas a una membrana PVDF. La toxina fue revelada con estreptoavidina acoplada a peroxidasa. Comparado con la cantidad de proteína puesta a incubar con las membranas la fracción que queda asociada a las VMMA después de los lavados es baja. Sin embargo, la proteína se puede detectar en VMMA del insecto sensible y el no sensible y en todos los pH de incubación. Se puede detectar una pequeña precipitación de Cyt1Aa a pH 4.4, pero esto es esperado al reducir el número de cargas que la mantienen en solución al acercarnos al pI de la toxina. Sin embargo, la precipitación a pH 4.4 parecía similar a la banda observada con *Manduca sexta*. Utilizando el programa Image J v1.406 (NIH, Estados Unidos, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) se realizó un análisis de densitometría sobre las bandas de pH 4.4, restando la precipitación a lo observado con VMMA. En *Manduca sexta* se disminuye mucho la señal, permitiendo suponer que hubo poca retención de toxina en las membranas. Podemos concluir que Cyt1Aa es capaz de asociarse por interacciones no electrostáticas a la membrana de un insecto sensible y uno no sensible, y que la alteración de las cargas disponibles (ya sea por la unión de biotina a lisinas o por cambio en pH) no debilita esta interacción diferencialmente entre los dos insectos excepto en el caso de la unión con *Manduca sexta* a pH ácido. Este último caso deberá ser corroborado haciendo un panel de pH ácidos y sin toxina biotinada para determinar si el efecto depende del pH o de la presencia de biotina.

Se decidió investigar si la unión de Cyt1Aa a VMMA podía ser competida por sí misma. La toxina Cyt1Aa competidora podría desplazar a la toxina biotinada al interactuar con la membrana por las otras formas no electroestáticas que mantienen la asociación. Se solubilizó y activó Cyt1Aa. Dado que se usarían grandes excesos de toxina no biotinada y el buffer de activación es de pH alcalino se cambió la toxina activada a PBS por medio de filtros Amicon 10 kDa. Esta toxina competidora se utilizó para preincubar VMMA de *Aedes aegypti* y *Manduca sexta* por 30 minutos a 25 °C. Después se agregó Cyt1Aa biotinada a una concentración de 5 nM y se incubó otros 30 min. Las vesículas fueron centrifugadas y los pellets resueltos en un gel SDS-PAGE de 15% acrilamida como anteriormente. La toxina asociada a las VMMA fue detectada por medio de estreptoavidina acoplada a peroxidasa. La figura 8.7 muestra la unión a VMMA de los dos insectos en presencia de cada vez más cantidad de Cyt1Aa competidora.

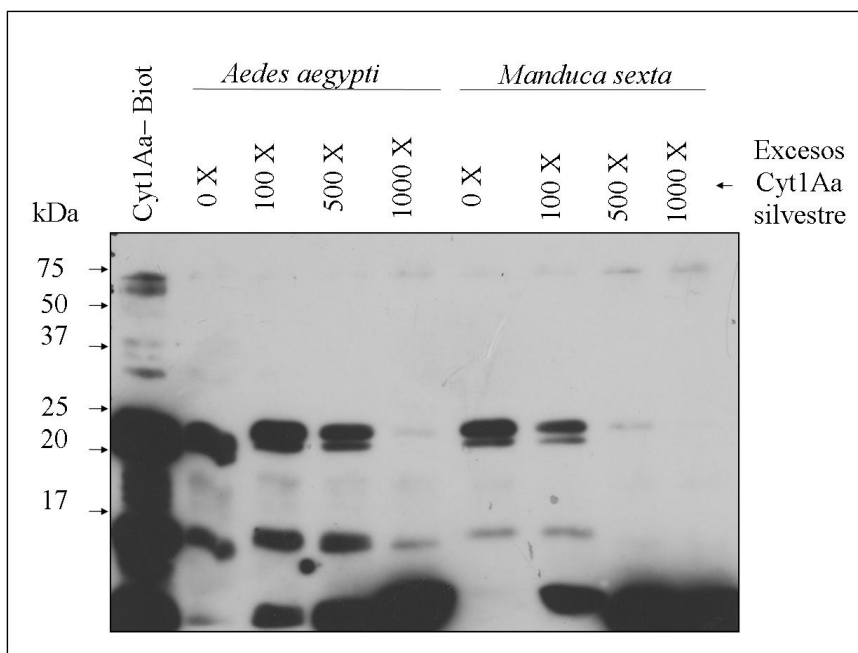


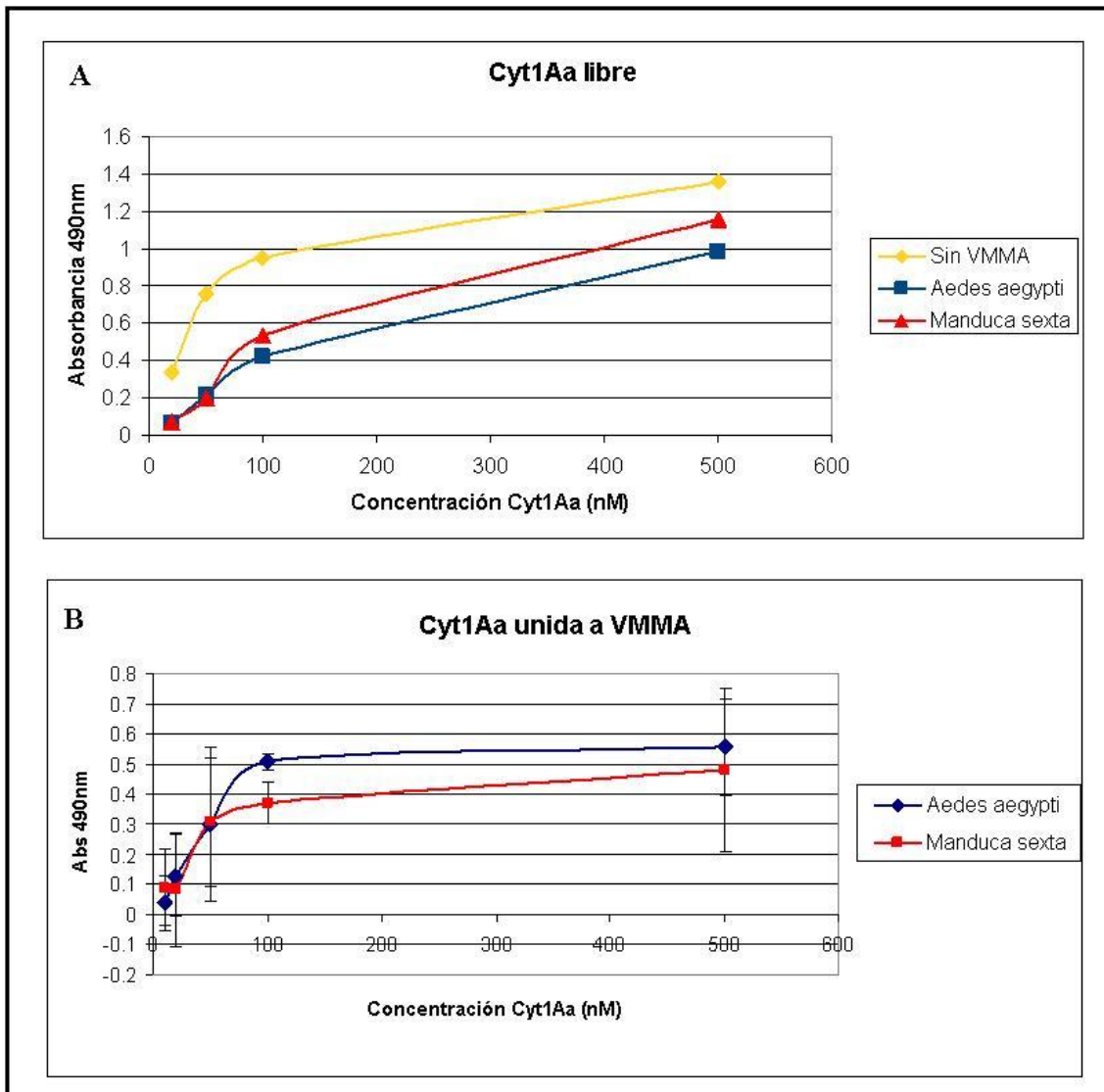
Figura 8.7 Competencia de Cyt1Aa biotinada en la unión a VMMA por Cyt1Aa silvestre.

Los resultados indican que a medida que es mayor la cantidad de excesos de Cyt1Aa se retiene menos toxina biotinada en las VMMA. Esta reducción ocurre más rápido en VMMA de *Manduca sexta* que en *Aedes aegypti*. Los resultados sugieren que las membranas de mosquito tienen una mayor capacidad de unir a la toxina. Aunque el efecto es pequeño es posible que en un insecto sensible la acumulación de Cyt1Aa en muchas células tuviera un resultado conjunto y se superara un umbral de intoxicación

que no se presenta en el insecto no sensible. Las bandas de ~15 kDa se retienen en *A. aegypti* y menos en *M. sexta*, reflejando el efecto con el monómero completo lo que podría sugerir una región de la toxina que sufre algún efecto diferencial. En ambos tipos de membrana se ve favorecida la agregación de péptidos pequeños a medida que incrementa la cantidad de Cyt1Aa silvestre. Es probable que estas dos bandas pequeñas representen fragmentos de degradación de Cyt1Aa ya que se pueden observar en la toxina soluble. No es posible saber a qué región de la toxina corresponden. Sería necesaria una exploración más profunda de fragmentos definidos de Cyt1Aa ante estos dos tipos de membrana para poder concluir con más conocimiento sobre esos resultados. La cuantificación de VMMA se hace con base en el contenido proteico y no los lípidos existentes. Así, no es posible asegurar que existiera el mismo número de sitios de unión no proteicos para Cyt1Aa en las membranas de ambos mosquitos en relación a la proteína cuantificada. Por lo tanto, el efecto de competición más rápida en VMMA de *M. sexta* podría tener dos explicaciones: que hubiera un menor número de sitios o que los sitios tuvieran menor afinidad. Se decidió evaluar la afinidad hacia las VMMA de ambos insectos para determinar cuál de las opciones era la más válida.

La posible diferencia en afinidad de la toxina Cyt1Aa biotinada por los dos tipos de membranas se probó con una curva de unión por medio de ensayos competitivos en placas de 96 pozos. Para estos ensayos se incubaron VMMA con concentraciones crecientes de toxina biotinada por media hora a 25 °C. A la par se incubaron concentraciones equivalentes de toxina pero sin VMMA. Todas las muestras después fueron transferidas a una placa de 96 pozos donde se había fijado previamente 1 µg de Cry11Aa por pozo, que se sabe une con gran afinidad a Cyt1Aa (en el orden de 0.8 nM [32]). Se dejó incubando sólo 5 minutos a 37 °C. Esto era para que sólo la proteína que no se hubiera unido a las membranas fuera retenida en la placa. Los pozos fueron lavados y se detectó la retención de Cyt1Aa por medio de estreptoavidina acoplada a peroxidasa. Este ensayo se repitió varias veces. Los valores de señal no son directamente comparables entre experimentos debido a que el máximo de señal obtenida por el sustrato colorimétrico varía de placa en placa. Sin embargo, la tendencia global se mantiene. La figura 8.8 el panel A muestra un trazo representativo de una repetición de los ensayos. Para comparar los ensayos entre sí, se decidió restar la toxina no unida de toda aquella disponible en solución para cada punto de la curva. Esta diferencia

representaría la toxina retenida en las membranas. En el panel B de la figura 8.8 se puede observar la curva de unión de 4 repeticiones con sus respectivos errores.



**Figura 8.8 ELISA cuantitativo de unión de Cyt1Aa a VMMA de *Aedes aegypti* y de *Manduca sexta*.**

El panel A es una repetición representativa de las curvas obtenidas. El panel B presenta las diferencias obtenidas al restar la toxina en el sobrenadante a la toxina disponible en varias repeticiones.

Los datos obtenidos de las uniones restando el fondo sin VMMA fueron analizados utilizando el programa Prism para Windows, versión 5.04 (Graphpad Software, San Diego, California, EUA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Utilizando una regresión no lineal sobre una curva de saturación con sitios específicos se obtuvo que la  $K_d$  de Cyt1Aa para VMMA *Aedes aegypti* es de 58.3 nM, mientras que para *Manduca sexta* es de 53.4 nM. Estos ensayos de unión indican que no existe una diferencia en la afinidad por las

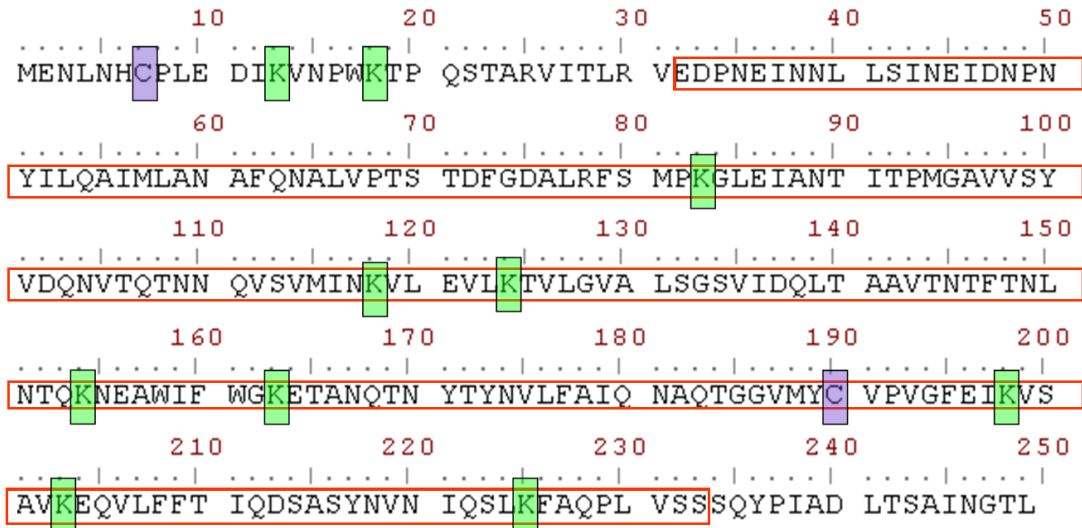
VMMA de los dos insectos probados. En ambos casos parece que la misma cantidad de toxina es retenida en las vesículas después de la incubación. También fue observado que a concentraciones altas de Cyt1Aa, por encima de 1  $\mu\text{M}$ , la toxina presentaba curvas de unión no muy reproducibles quizá debido a que se ha entrado en el umbral de su acción detergente. Aunque los dos tipos de membranas muestran afinidad similar, la mayor facilidad para competir Cyt1Aa en VMMA de *M. sexta* indica una diferencia en la forma de unirse entre ambos insectos.

#### **8.4 Purificación de Cyt1Aa activada**

Los datos anteriores indican en conjunto que Cyt1Aa se puede solubilizar, activar y unir a membranas intestinales en un insecto sensible y no sensible. Aunque en liposomas Cyt1Aa fue capaz de formar un agregado esto no necesariamente refleja el estado que podría existir en una membrana nativa que incluye, además de lípidos, a muchos complejos proteicos y azúcares. Algún elemento de composición en el insecto no sensible pudiera impedir el contacto de monómeros de la toxina o la adopción de una conformación permisiva para la formación de poros. Por esta razón se buscó ver como diferentes tipos de membranas influían en la forma de inserción de la toxina.

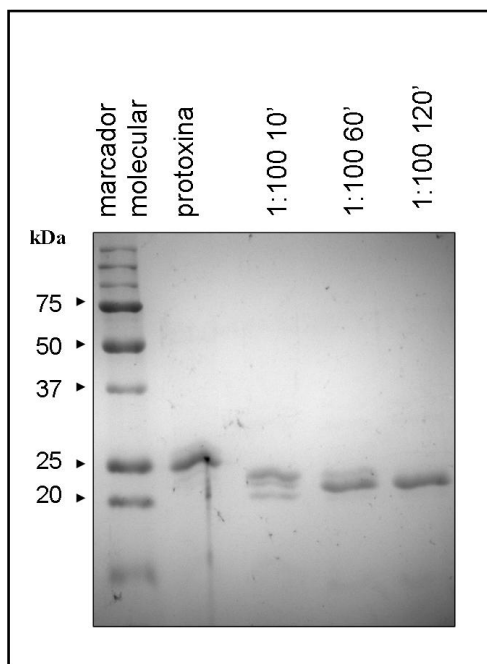
Para investigar la interacción y conformación adoptada por Cyt1Aa en diferentes membranas se decidió marcar la toxina con un fluoróforo no sensible a polaridad, con buen rendimiento cuántico. Se requería de toxina activada a un fragmento único y purificado de la proteasa utilizada durante la activación a fin de eliminar posibles artefactos en los experimentos.

Los aminoácidos más utilizados para marcar una proteína con un fluoróforo extrínseco son las cisteínas y las lisinas. Es deseable tener un sólo sitio de marcado ya que esto facilita el análisis de la fluorescencia. Cyt1Aa posee en su forma no procesada 2 cisteínas y 10 lisinas. La forma completamente activada posee solamente una cisteína, C190 (Figura 8.9) Esta característica propia de la toxina silvestre permite no tener que realizar mutagénesis para establecer un sitio único de marcaje.



**Figura 8.9 Ubicación de posibles sitios de marcaje con fluoróforos extrínsecos en Cyt1Aa.** Las lisinas se marcan con verde y las cisteínas con morado. El fragmento que representa a la toxina activada se encuentra bordeado en rojo.

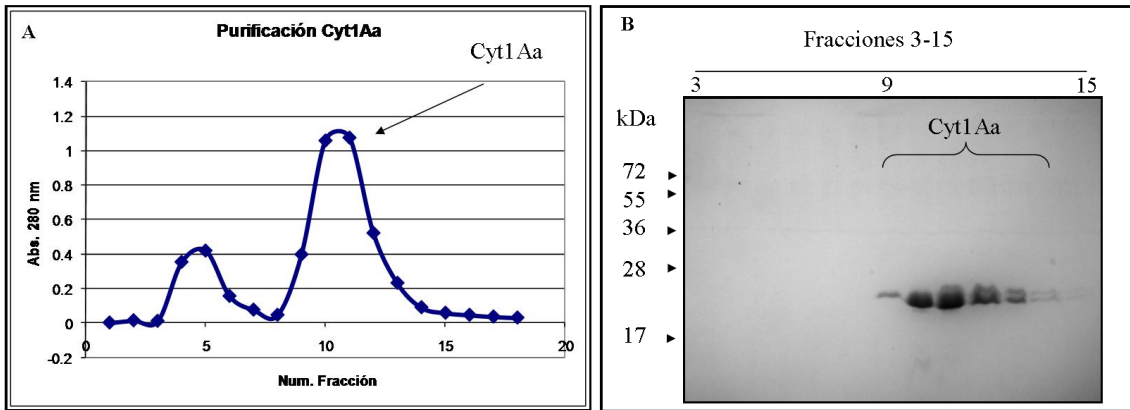
El procesamiento de Cyt1Aa consiste en eliminar un fragmento en el N-terminal y uno en el C-terminal y por secuenciación y espectrometría de masas después de proteólisis con proteinasa K se conocen los extremos remanentes [59]. Dado que no existe un orden en que esto ocurra una activación incompleta dejaría formas intermedias entre la protoxina de 25 kDa y la toxina de 22kDa. Algunas de estas formas poseerían aún la cisteína C7. Probando diferentes tiempos y condiciones de activación con proteinasa K se encontró que la incubación por 2 horas a 30°C en una relación 1:100 daba una banda única del tamaño esperado para la toxina completamente activada (Figura 8.10).



**Figura 8.10 Condiciones para procesamiento completo de Cyt1Aa por proteinasa K.**

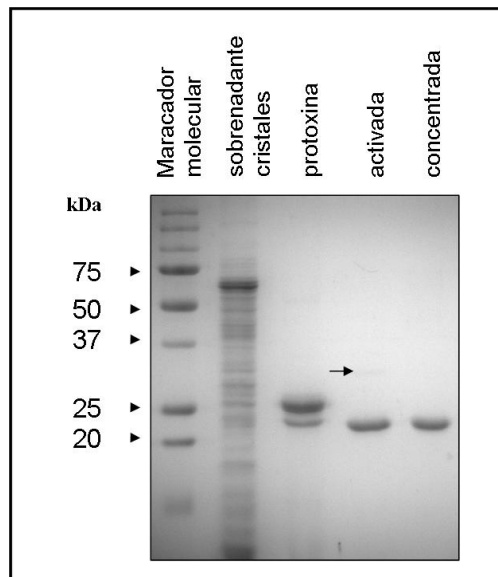
La proteinasa K utilizada en la activación es de Sigma-Aldrich, y el proveedor indica que su proteína fue obtenida del hongo *Tritirachium album*. Un análisis de la secuencia revela que esta proteasa tiene 5 cisteínas y un coeficiente de extinción de  $41050 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , que es dos veces aquél de la Cyt1Aa activada, con  $19940 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . La presencia de la proteasa en la muestra afectaría tanto la cuantificación por absorbancia como el marcaje al generar más sitios para unir los reactivos que reaccionan con grupos tiol por lo que era necesario separar ambas proteínas. No es práctico separar por exclusión de peso molecular (29 kDa para proteinasa K y 22 kDa para Cyt1Aa activada) pero una separación por intercambio iónico es adecuada, ya que el pI de la proteinasa K es indicado por el proveedor como 8.9 y Cyt1Aa activada tiene un pI de 4.4.

Se escogió una resina de intercambio aniónico DEAE de Toyopearl para la separación por columna. La columna es equilibrada a un pH de 7.5. En esta columna primero eluiría la proteinasa K y la Cyt1Aa empezaría a eluir al agregar las soluciones con NaCl, desplazando a la toxina de la resina. Se probaron diferentes tamaños de columna pero para no diluir la toxina en demasiado volumen de fraccionamiento se usó un volumen de 500  $\mu\text{l}$ . La figura 8.11 muestra cromatograma de absorbancia de las fracciones a 280 nm de una corrida típica y un gel SDS-PAGE del 15% teñido con Coomassie donde se puede observar la banda correspondiente a Cyt1Aa sólo en las fracciones del segundo pico de cromatograma.



**Figura 8.11 Cromatografía de Cyt1Aa por intercambio iónico.** A) Medición de absorbancia a 280 nm de las fracciones recuperadas. B) Tinción con Coomassie de las fracciones.

Las fracciones con toxina fueron concentradas y lavadas con PBS por medio de un dispositivo Amicon Ultra-4 con un corte de tamaño molecular de 5 kDa. El rendimiento de la proteína solubilizada desde cristales de Cyt1Aa hasta la toxina purificada y concentrada es cerca de 30%. En la figura 8.12 se muestra un gel SDS-PAGE de tinción de Coomassie donde se puede observar como la banda correspondiente a la proteinasa K se pierde en la muestra purificada concentrada. En todos los carriles se cargaron 5  $\mu$ g de proteína de acuerdo a las cuantificaciones correspondientes.



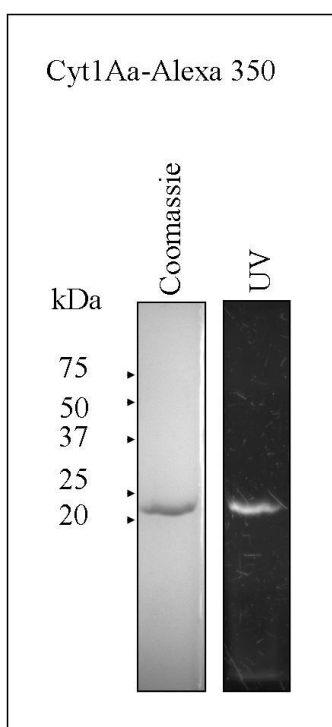
**Figura 8.12 Comparación de Cyt1Aa en diferentes puntos de purificación.** La flecha indica la banda que corresponde a proteinasa K.



## 8.5 Inserción de Cyt1Aa en VMMA

Se eligió el fluoróforo Alexa-350 (Molecular Probes, EUA) quien posee un rendimiento cuántico muy alto y cuya fluorescencia es poco sensible a la polaridad. La intensidad de señal era importante para superar el fondo generado por la composición de las VMMA. Además, este fluoróforo es posible de apagar con KI y lípidos brominados.

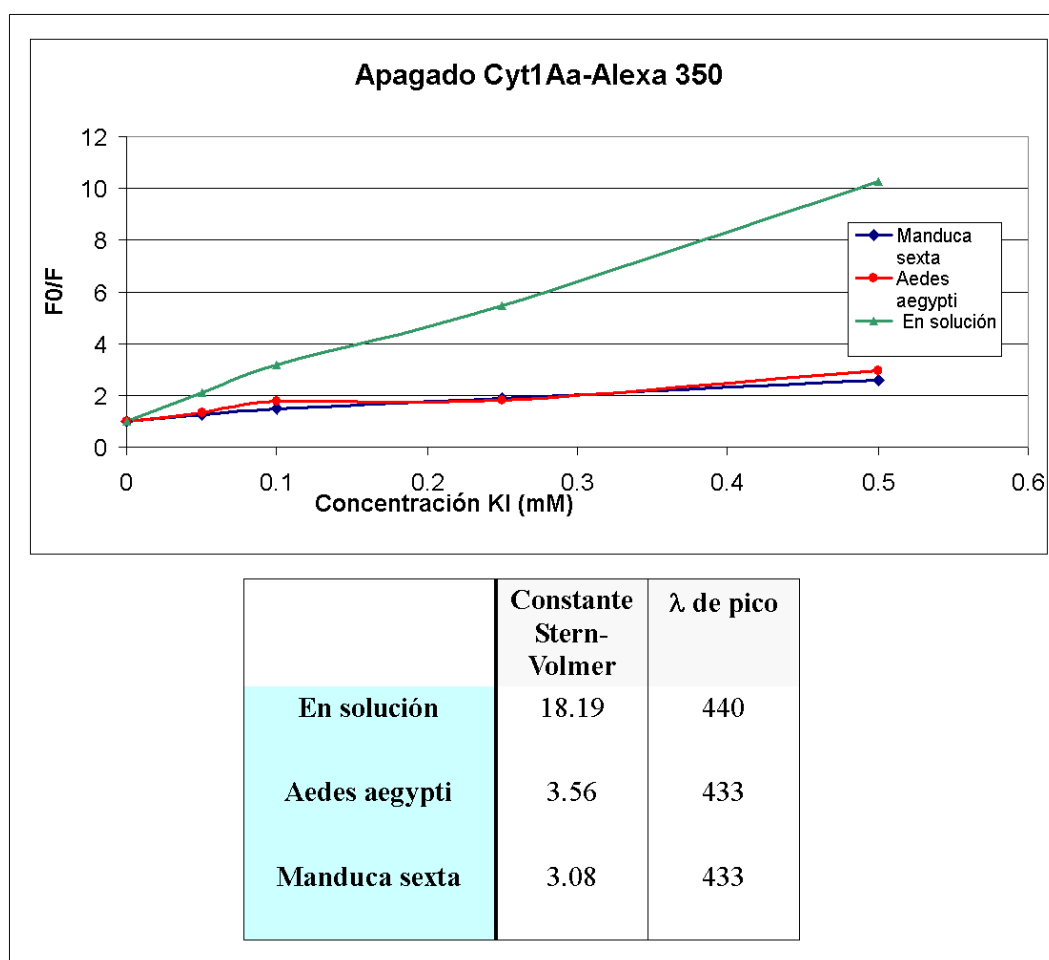
Para marcar Cyt1Aa con Alexa-350 la toxina activada fue purificada y concentrada y después puesta en incubación con 50 excesos molares del fluoróforo. La figura 8.13 muestra la tinción con Coomassie y la transiluminación con luz UV de un gel SDS-PAGE del 15% para detectar el fluoróforo asociado a la toxina.



**Figura 8.13** Marcaje de Cyt1Aa con Alexa-350 y la verificación de la unión de fluoróforo.

Con esta toxina marcada se evaluó la accesibilidad del residuo C190 al solvente por medio de apagado con KI. En otros experimentos en el laboratorio se observó que la Cyt1Aa marcada con 1,5-IAEDANS en C190 retenía actividad hemolítica de forma similar a la toxina silvestre por lo que se puede concluir que el marcaje en este residuo no abate la función de la proteína y podemos suponer una actividad normal ante la presencia de VMMA.

La toxina detectada en unión a VMMA podría estar agregada en la superficie de la membrana o con penetración en la bicapa. Ambas situaciones propiciarían un cambio de la polaridad del ambiente circundante a uno menos polar que en solución y forma monomérica. De estar agregado en la superficie de la membrana es más probable que el residuo sea accesible al solvente y por lo tanto al apagamiento por KI. Se realizaron curvas de apagado de Cyt1Aa-Alexa 350 con KI en solución y también el pellet de una incubación de 1 hora con VMMA de *Aedes aegypti* o de *Manduca sexta*. Las fluorescencias registradas en el pico de emisión fueron utilizadas para calcular F0/F. Con estos valores se hizo una regresión lineal y se calculó la constante de Stern-Volmer para cada curva. La figura 8.14 muestra los trazos de estas curvas de apagamiento así como la constante de Stern-Volmer y la longitud de onda del pico de emisión.



**Figura 8.14** Curvas de apagamiento de Cyt1Aa-Alexa 350 con KI. Para el apagado en solución se utilizó 1  $\mu\text{g}$  de toxina y para los apagados en VMMA se utilizaron 4  $\mu\text{g}$  de toxina y 10  $\mu\text{g}$  de vesículas.

Los experimentos de apagado de fluorescencia indican que en VMMA del insecto sensible y el insecto no sensible Cyt1Aa adopta una conformación donde el residuo C190 se esconde del solvente. Aunque el fluoróforo Alexa-350 es poco sensible a la polaridad en C190, el corrimiento a azul del pico de emisión de Alexa-350 en las muestras con VMMA apoyan que esta cisteína se encuentra en un ambiente menos polar que al que está expuesto en solución, en similitud a otros fluoróforos como el 1,5-IAEDANS [60]. La constante de Stern-Volmer en VMMA se ve reducida unas 6 veces en ambos insectos con respecto al valor en solución lo que indica menor accesibilidad. En conjunto, se puede concluir que no se puede apreciar una diferencia en la forma que C190 se ubica al insertarse en VMMA de un insecto sensible y uno no sensible. Sin embargo, este es sólo un residuo de la proteína y un acercamiento al mapeo de la ubicación de diferentes regiones de la toxina. Aunque este residuo en específico no muestre distinciones es posible que otras regiones de la toxina muestren diferencias en su comportamiento entre las diferentes membranas. Las regiones de oligomerización podrían ocluirse y así evitar la formación de agregados funcionales.

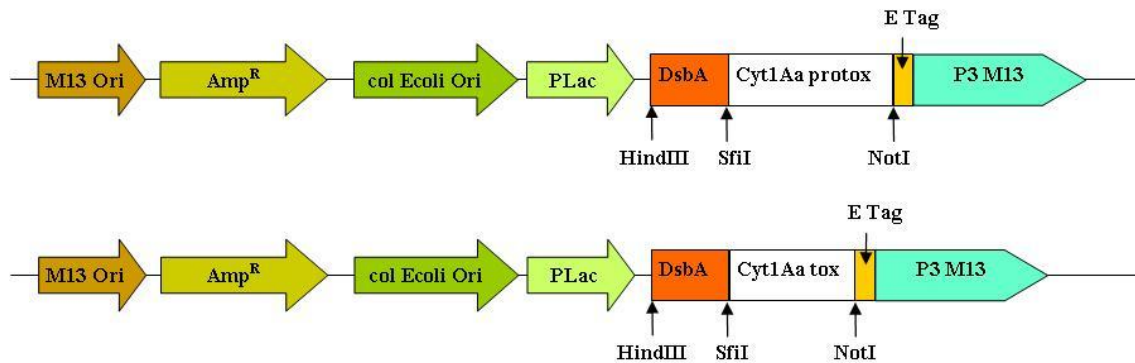
## **II: Discriminación de especificidad en contexto de despliegue en fagos**

### **8.6 Despliegue en fagos de Cyt1Aa**

La técnica de despliegue en fagos M13 nos permite tamizar una biblioteca de péptidos contra un sustrato de interés al fusionar dichos péptidos a proteína P3 del fago. Éstos péptidos pueden ser proteínas completas. Nos interesa utilizar esta tecnología para recuperar variantes de Cyt1Aa que presenten mejor actividad en membranas de *Manduca sexta* que aquellas de *Aedes aegypti*. Este cambio en especificidad de la toxina sería una herramienta potente para el combate a la resistencia que se podría desarrollar en lepidópteros hacia toxinas de *Bt*.

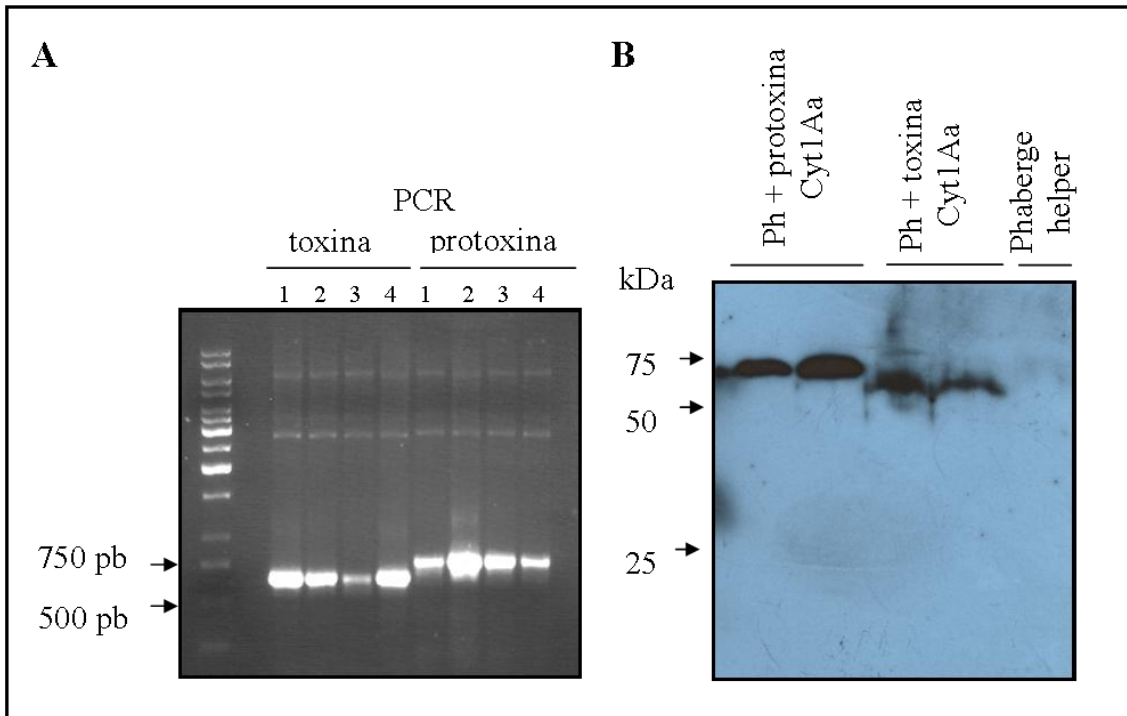
Antes que generar una biblioteca de variantes se requería determinar si Cyt1Aa silvestre era capaz de ser desplegada en el fago M13. Para esto se modificó el fagémido pCANTAB para generar una fusión que incluyera el péptido DSB, que sirve de señal para una translocación al periplasma de *E. coli* de forma co-traducciona, donde se arma la cápside del fago. Esta estrategia se ha visto que mejora la eficiencia de despliegue de proteínas completas [47]. Una modificación adicional al fagémido fue la eliminación del

codón ámbar de paro para poderse usar con el sistema Phaberge. Se generaron dos construcciones de fusiones de Cyt1Aa: una que abarcaba la secuencia completa de la protoxina y otra con sólo el fragmento tóxico. La figura 8.15 muestra las construcciones.



**Figura 8.15 Construcciones para despliegue de Cyt1Aa en fusión con P3 en Phaberge.** La construcción de la protoxina abarca desde Met1 hasta Leu249 y la toxina desde Glu32 hasta Ser234. M13 ori es el origen de replicación del fago y col Ecoli el de *Escherichia coli*. PLac es el promotor de lactosa y Amp<sup>R</sup> la resistencia a Ampicilina. DsbA es el péptido señal para el sistema de translocación SRP y el E Tag es para del linker de la fusión.

Utilizando el sistema Phaberge, se pudo desplegar eficientemente la fusión Cyt1Aa-P3. La figura 8.16 muestra el PCR de varias colonias candidato a tener el fagémido. Se observan los productos del tamaño esperado. Por secuenciación se comprobó la presencia de la proteína sin mutaciones. También se muestra un Western Blot donde se detecta la proteína fusión en dos distintos ensayos de despliegue utilizando un anticuerpo monoclonal contra Cyt1Aa. Ambas construcciones son desplegadas, aunque la fusión con la protoxina muestra mejor eficiencia en ambos lotes de viriones producidos y su despliegue es mucho más reproducible.



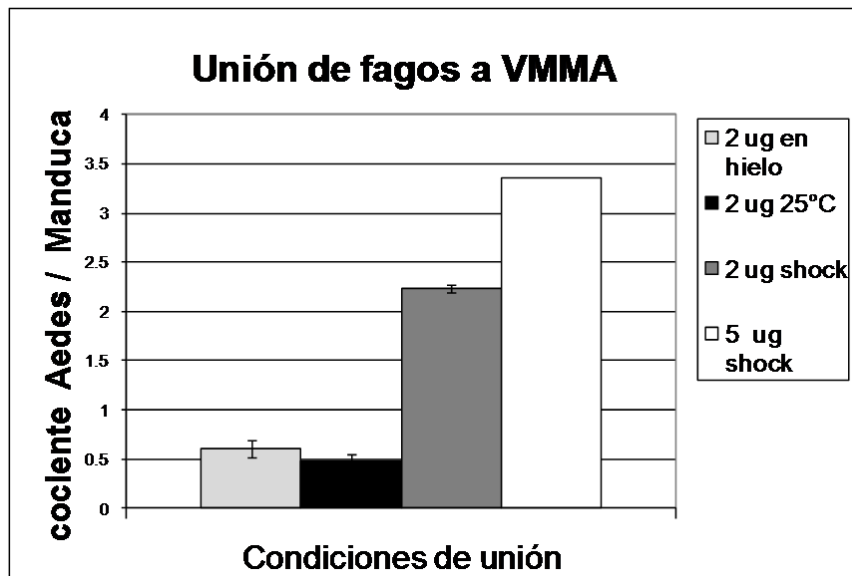
**Figura 8.16. Despliegue de Cyt1Aa en Phaberge.** A) PCR de colonias candidatas con el inserto de la proteína fusión. B) Western Blot monoclonal contra Cyt1Aa para detectar fusión.

### 8.7 Selección de fagos en VMMA

Teniendo las condiciones para desplegar Cyt1Aa en el fago M13 se buscaron condiciones que permitieran detectar una inserción específica por parte de la toxina. Es decir, se busca una condición donde el número de fagos recuperados incubando con VMMA de *Aedes aegypti* sea mayor que aquellos recuperados en VMMA de *Manduca sexta*. En tamizajes posteriores con bibliotecas de variantes de Cyt1Aa se buscarían fagos que inviertan esta relación.

Los fagos con la fusión fueron puestos a interactuar con VMMA derivadas de ambos insectos. Las condiciones de unión y lavado son descritas en materiales y métodos. Para estos ensayos se utilizó la fusión con la protoxina ya que, además de tener mejor eficiencia de despliegue, posee un extremo C-terminal más largo lo que le da mayor independencia a la toxina desplegada dentro de la fusión con P3. También se agregó un tratamiento con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  como en los ensayos con Cyt1Aa biotinada para eliminar interacciones electrostáticas inespecíficas. Se agregó manitol a la solución de este tratamiento para igualar el buffer al interior y al exterior de las vesículas y que no existiera un ruptura de las vesículas por acción de la toxina desplegada. Esto se vio que

mejoraba el rendimiento de fagos recuperados. Se probaron diferentes condiciones de incubación. Se incluyó un tratamiento con un shock térmico a 30 °C para permitir asociación lenta de monómeros y sólo un pequeña ventana de inserción, pensando en los efectos observados en eritrocitos [18]. Esto se hizo bajo la suposición que reduciría el daño a VMMA por la toxina. Los fagos recuperados en las VMMA lavadas fueron utilizados para infectar un cultivo de *E. coli* XL1- Blue y seleccionados en medio LB con ampicilina ante la cual el fagémido posee un cassette de resistencia. El número de colonias fue contabilizado y se asume que refleja el número de fagos recuperados.



**Figura 8.17 Selección de fagos fusión en VMMA en diferentes condiciones de incubación.** Las barras indican las diferentes condiciones de incubación: con 2 o 5 µg de VMMA, e incubación en hielo, a 25°C o en hielo y después a 30 °C (“shock”).

La figura 8.17 indica el número de colonias contabilizadas. Se utiliza el cociente de colonias recuperadas en VMMA de *A. aegypti* contra aquellas en *M. sexta* ya que el número absoluto de colonias tiene variación entre experimentos, posiblemente debido a la viabilidad o expresión de pili por parte de las células del cultivo utilizado para la infección. Como se puede observar, la incubación a 4 °C y el shock térmico de 30 °C presenta las condiciones donde se aprecia una unión más específica a VMMA de *Aedes aegypti* por parte de los fagos con proteína fusión. Al incrementar la cantidad de VMMA utilizadas (de 2 a 5 µg) para incubar con los fagos uno puede incrementar este cociente. Esto quizá se debe a presentar mayor superficie para incorporar los fagos, aunque en todos los casos hay una reducción de alrededor de 2 órdenes de magnitud entre el número de fagos incubados y el número de fagos recuperados. Esto sugeriría

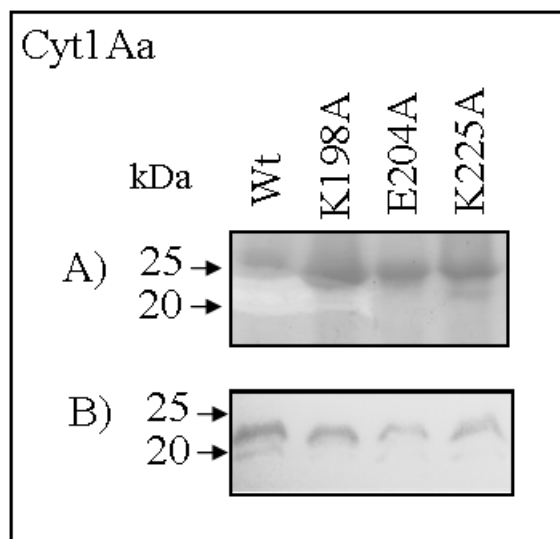
que ya se tiene saturación del número de fagos recuperables. Estas condiciones de incubación podrían ser utilizadas posteriormente en más estudios para encontrar diferencias en la interacción de Cyt1Aa con células de insectos no sensibles y sensibles. Es posible, sin embargo, que estas condiciones sean sólo útiles cuando se trata de Cyt1Aa en el contexto del fago y que la diferencia observada no sea transportable al contexto de la toxina en solitario, como se observó en los ensayos previos con VMMA. Se requiere más investigación sobre condiciones que permitan incrementar la relación de fagos retenidos en *Aedes aegypti* vs *Manduca sexta* para tener una situación más óptima para la selección de una biblioteca de variantes de Cyt1Aa. Lo que es claro es que existe alguna propiedad de la protoxina que favorece la unión de Cyt1Aa a *Aedes aegypti* y representa una diferencia en la forma en que esta proteína interactúa con las VMMA derivadas de ambos insectos.

### **III: Especificidad en interacción con toxinas Cry de *Bti***

Los experimentos para desarrollar este punto fueron realizados en estrecha colaboración con M.C. Esmeralda Reyes, quien fue de apoyo importante en la generación de las mutantes de Cry4Ba y los ensayos de unión.

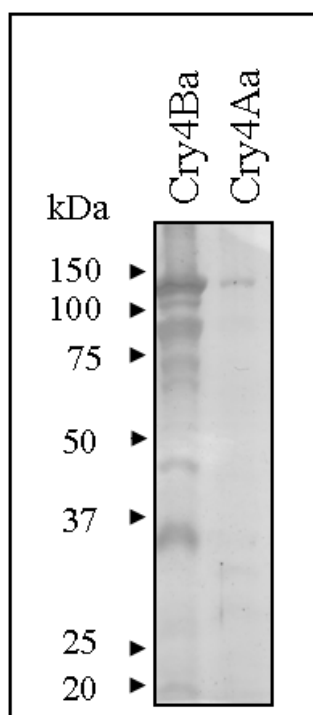
#### **8.8 Mutantes de Cyt1Aa y Cry4Ba**

Como último objetivo se buscó evaluar si la interacción que se había visto previamente entre Cry11Aa y Cyt1Aa y que estaba involucrada en el sinergismo entre dichas toxinas era específica de esta pareja o era compartida con las otras toxinas Cry de *Bti*. Como primer paso era obtener mutantes en las regiones de interacción. Las mutantes de Cyt1Aa seleccionadas se habían utilizado previamente [32] y se corroboró su producción y activación. Estas mutantes son la K198A, E204A, y K225A. La figura 8.18 muestra la producción y activación con proteínasa K de las mutantes en comparación con la proteína silvestre. Todas las mutantes se producen adecuadamente y se activan de forma parecida a la silvestre.



**Figura 8.18. Producción y activación de mutantes de Cyt1Aa.** El panel A muestra la producción de cristales en *Bt*. El panel B muestra 2 µg de las toxinas después de solubilización en búfer de carbonatos pH 10.5 y activación con proteínaasa K. Ambos experimentos son tinciones con Coomassie.

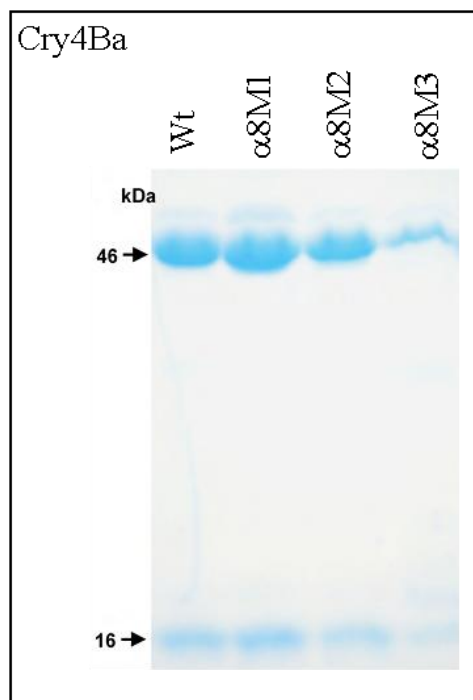
Para los bioensayos con *Aedes aegypti* se necesitaría también espora-cristal de Cry4Ba y Cry4Aa. Estas toxinas fueron producidas en *Bt* y la figura 8.19 muestra la producción de ellas. Cry4Ba produce cristales de forma abundante mientras que Cry4Aa tiene una producción mucho más limitada, aunque en ambos casos se pueden observar como banda mayoritaria cercana a 130 kDa, lo esperado para la protoxina de las toxinas Cry4.



**Figura 8.19. Producción de toxinas Cry4.** Un volumen igual de cultivo de espora-cristal fue resuelto por SDS-PAGE y teñido con Coomassie.

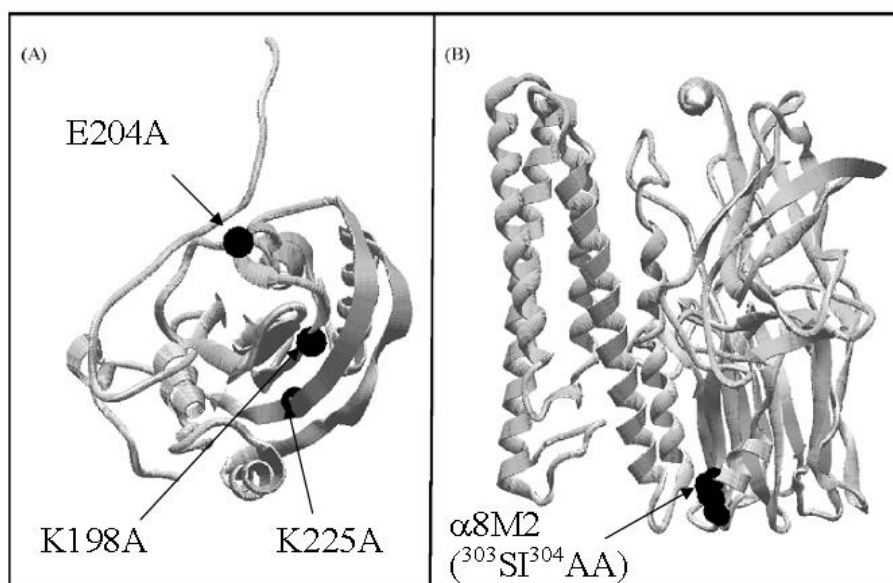


Como parte de su trabajo de maestría Esmeralda Reyes diseñó mutantes en las asas 2, 3 y el  $\alpha 8$  del dominio II de Cry4Ba. Debido a que se vio que las mutantes de Cry11Aa en el  $\alpha 8$  del dominio II se veían afectadas en unión a Cyt1Aa se decidió utilizar mutantes de Cry4Ba en el  $\alpha 8$  dominio II para evaluar su efecto sobre la sinergia. Estas mutantes fueron hechas por reemplazos de aminoácidos por alaninas. Estas mutantes son las siguientes:  $\alpha 8M1$  (SSK300-302AAA),  $\alpha 8M2$  (SI303-304AA) y  $\alpha 8M3$  (LE307-308AA). La figura 8.20 muestra a las mutantes  $\alpha 8M1$ ,  $\alpha 8M2$  y  $\alpha 8M3$  después de ser solubilizadas, activadas con tripsina, y cuantificadas. Aunque todas las mutantes se activan a una banda de tamaño esperado como la silvestre, la mutante  $\alpha 8M3$  puede que sea menos estable y sufra mayor procesamiento debido a que se obtiene menor cantidad de proteína en comparación con las otras proteínas. Por esta razón se continuaron los experimentos sólo considerando a las mutantes  $\alpha 8M1$  y  $\alpha 8M2$ .



**Figura 8.20. Activación de mutantes en Cry4Ba.** Se resolvieron 5  $\mu\text{g}$  de proteína en un gel SDS-PAGE y se tiñó con Coomassie.

La figura 8.21 indica la ubicación algunas de las mutantes a utilizar en los bioensayos y en los experimentos de unión. Las mutantes de Cry4Ba no mostradas se ubican en la misma región ( $^{300}\text{SSKSIAALE}^{308}$ ).



**Figura 8.21. Ubicación de mutantes de Cyt1Aa y Cry4Ba.** Las estructuras tridimensionales corresponden al modelo de Cyt1Aa obtenido desde Cyt2Aa (panel A) y la estructura cristalográfica de Cry4Ba (panel B).

### 8.9 Efectos *in vivo* sobre el sinergismo

Para evaluar el efecto en sinergia de las mutantes de Cyt1Aa sobre las toxinas Cry4 de *Bti* se montaron bioensayos contra larvas de 4<sup>to</sup> instar de *Aedes aegypti*. En vasos con 100 ml de agua se agregaron dosis de los cultivos espora-cristal de las toxinas y se cuantificó la mortalidad a las 24 horas de exposición. Los datos de las dosis fueron procesados por análisis de Probit con el programa POLO-PC [51] y se obtuvieron las dosis letales para obtener el 50% de mortalidad (LC<sub>50</sub>) para cada una de las toxinas por separado. La tabla 8.1 muestra los valores obtenidos de esta forma así como los intervalos de 95% de confianza. Las mutantes K198A y K225A de Cyt1Aa muestran una toxicidad similar a la silvestre mientras que la mutante E204A indica que es más tóxica con una LC<sub>50</sub> unas 9 veces menor. Por su lado las mutantes de Cry4Ba se observan con una toxicidad similar a la toxina silvestre. Entre Cry4Ba y Cry4Aa es la primera la que muestra mayor toxicidad contra *A. aegypti*.

Toxina	LC <sub>50</sub> (ng/ml)
Cyt1Aa	925.5 (602.5-1824.3)
K198A	601.8 (466.3-792.7)
E204A	103.9 (80.3-134.9)
K225A	858.6 (548.5-1427.6)
Cry4Ba	79.4 (61-102)
α8M1	117.2 (93.9-146.6)
α8M2	182.2 (77.9-358.8)
Cry4Aa	431.7 (374.3-495.2)

**Tabla 8.1. LC50 de toxinas.** Las toxicidades fueron evaluadas de forma individual contra *A. aegypti*.

Una vez que se contaba con las toxicidades individuales se utilizó la fórmula de Tabashnik [52] para obtener una predicción de la letalidad esperada por efecto aditivo simple de las toxinas considerando una proporción de 1:4 de Cyt1Aa:Cry4 en las dosis totales administradas a las larvas. Después, se hicieron bioensayos con mezclas de las toxinas en estas mismas proporciones y se obtuvo la LC<sub>50</sub> como anteriormente. El cociente de la LC<sub>50</sub> esperada y la obtenida en bioensayos nos proporcionan el factor de sinergismo. La tabla 8.2 indica los datos obtenidos para las mezclas de toxinas silvestres, de mutantes de Cyt1Aa con Cry4Ba y Cry4Aa silvestres y la mezcla de mutantes en Cyt1Aa y la mutante α8M2 de Cry4Ba. Podemos observar que todas las mutantes de Cyt1Aa muestran una reducción en su factor de sinergismo con Cry4Ba, siendo la mayor reducción con la mutante K225A. El uso de la mutante α8M2 también reduce por sí misma el factor de sinergismo. La mezcla de la mutante E204A junto con la mutante α8M2 reduce aún más el factor de sinergismo observado, pasando de 2.6 a 2. Con Cry4Aa la mutante E204A reduce de manera drástica el factor de sinergismo mientras que la mutante K225A no parece tener efecto negativo.

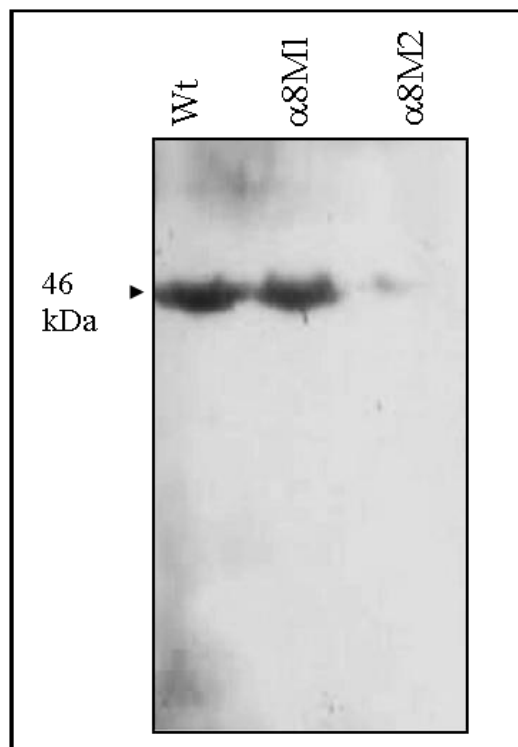
Toxinas Cyt1Aa: Cry4	LC <sub>50</sub> predicha (ng/ml)	LC <sub>50</sub> experimental (ng/ml)	Factor de Sinergismo
Wt: Cry4Ba Wt	75.2	8.5 (6.5-10.8)	8.8
K198A: Cry4Ba Wt	74.5	21.0 (10.1-30.1)	3.5
E204A: Cry4Ba Wt	66.7	25.2 (20.1-32.3)	2.6
K225A: Cry4Ba Wt	75.1	41.4 (31.1-52.3)	1.8
Wt: Cry4Ba $\alpha$ 8M2	218.9	38.4 (32.7-52.3)	5.7
E204A: Cry4Ba $\alpha$ 8M2	158.3	77.2 (67.1-88.9)	2
Wt: Cry4Aa Wt	484.7	13.4 (11.3-15.7)	36.1
E204A: Cry4Aa Wt	264.7	61.1 (46.2-81.1)	4.3
K225A: Cry4Aa Wt	479.4	12.2 (7.2-19.0)	39.2

**Tabla 8.2. Ensayos de sinergismo entre Cyt1Aa y toxinas Cry4.** La toxicidad es evaluada con una relación 1:4 de Cyt1Aa:Cry4 contra larvas 4<sup>o</sup> instar de *A. aegypti*. La LC<sub>50</sub> se obtuvo a partir de la ecuación de Tabashnik y las toxicidades experimentales por medio de análisis de Probit.

Todo esto indica que sí hay un efecto similar entre las toxinas Cry4 y Cyt1Aa como fue observado entre Cry11Aa y Cyt1Aa. Los mismos epítopes que se vio estaban involucrados en la sinergia entre Cry11Aa y Cyt1Aa están involucrados en la sinergia entre Cyt1Aa y Cry4Ba o Cry4Aa. La mutante Cyt1Aa E204A muestra un efecto de reducción en sinergismo tanto para Cry4Ba y Cry4Aa, fenómeno observado también para Cry11Aa [32]. La mutante Cyt1Aa K225A, que había mostrado una reducción en sinergismo con Cry11Aa, reduce el sinergismo con Cry4Ba pero no Cry4Aa. La mutante Cyt1Aa K198A muestra reducción en sinergismo con Cry4Ba, efecto que es opuesto a aquél visto con Cry11Aa donde hubo un incremento en factor de sinergismo. Las diferencias observadas pueden deberse a diferencias en las propiedades de cada toxina y la forma en que interactúan entre sí las toxinas. Hay que recordar la baja conservación entre Cry11Aa y las toxinas Cry4Ba y Cry4Aa. En general, la región del asa  $\alpha$ 8 de Cry4Ba parece estar involucrada en la interacción con Cyt1Aa de igual forma que la región del  $\alpha$ 8 de Cry11Aa lo fue a su vez. Esto sugiere que el mecanismo de interacción con Cyt1Aa está compartido entre las toxinas Cry de *Bti*.

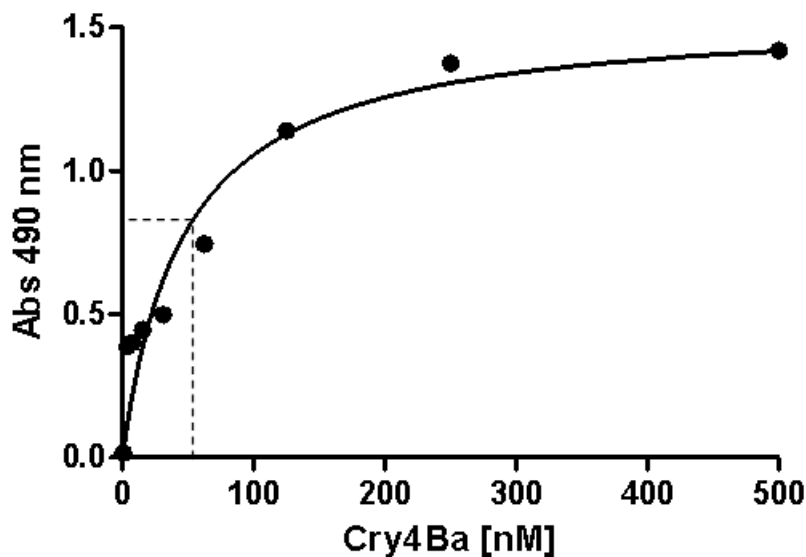
## 8.10 Unión entre Cyt1Aa y Cry4Ba

Un último paso era comprobar que los efectos observados *in vivo* pudieran explicarse mediante una correlación en la unión (o falta de) entre toxinas *in vitro*. El primer ensayo fue probar la unión mediante ensayos tipo Ligand Blot. Para esto se resolvieron en un gel SDS-PAGE Cry4Ba y las dos mutantes a probar. Después las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF. Esta membrana fue después incubada con Cyt1Aa silvestre marcada con biotina. Se detectó esta última proteína mediante estreptoavidina acoplada a peroxidasa. La figura 8.22 muestra el resultado de estos experimentos. Se puede observar que la unión entre Cry4Ba  $\alpha 8M1$  y Cyt1Aa silvestre es similar a aquella obtenida en la unión en toxinas silvestres. Por otro lado la unión con la mutante  $\alpha 8M2$  se ve reducida con respecto a la silvestre, lo que está en acuerdo con la disminución de sinergismo registrada en bioensayos.



**Figura 8.22. Ligand blot entre Cyt1Aa y Cry4Ba y mutantes.** Cry4Ba y mutantes fueron resueltas en SDS-PAGE, transferidas e incubadas con Cyt1Aa biotinada. La toxina Cyt1Aa unida a la membrana fue detectada con estreptoavidina.

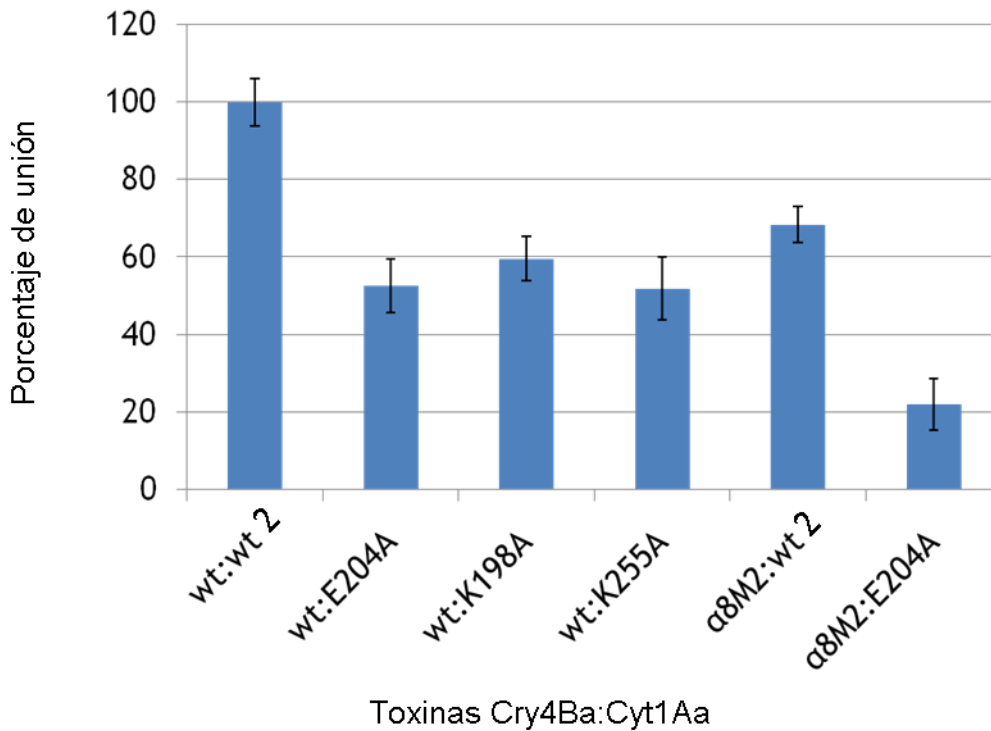
Para corroborar estos resultados se buscó evaluar la unión entre Cry4Ba y Cyt1Aa mediante ensayos de ELISA. Como primer paso se realizó una curva de unión entre toxinas silvestres para encontrar condiciones no saturantes donde se pudieran distinguir cambios en unión entre Cyt1Aa silvestre y sus mutantes hacia Cry4Ba. En una placa de 96 pozos se fijó Cyt1Aa silvestre. Esta toxina fijada fue expuesta a concentraciones crecientes de Cry4Ba silvestre. La toxina Cry4Ba retenida en la placa fue detectada con un anticuerpo policlonal y éste a su vez detectado con un anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa. Se incubó con un sustrato colorimétrico de orto-fenilendiamina y se leyó la señal a 490 nm. La figura 8.23 muestra la curva obtenida en estos ensayos. Se puede ver una buena curva de saturación. Utilizando esta curva se decidió usar el punto de mitad de absorbancia máxima para determinar la concentración de Cry4Ba a la cual se probaría la unión entre Cyt1Aa y Cry4Ba, siendo éste punto una Kd aparente de 47 nM.



**Figura 8.23. Curva de unión por ELISA entre Cyt1Aa y Cry4Ba.** La placa fue cubierta con 250 ng de Cyt1Aa por pozo e incubada con diferentes concentraciones de Cry4Ba.

Para investigar las posibles diferencias en unión entre las mutantes de Cry4Ba y Cyt1Aa se fijaron en una placa de 96 pozos Cyt1Aa silvestre y sus mutantes. Éstas después fueron incubadas con 75 nM de Cry4Ba. Además se probó la mezcla de Cyt1Aa E204A con Cry4Ba  $\alpha$ 8M2 como se hizo en los bioensayos. La toxina Cry4Ba unida fue detectada con un anticuerpo anti Cry4Ba y después detectado con un anticuerpo

secundario contra conejo acoplado a peroxidasa. La figura 8.24 indica los resultados de estas uniones por ELISA. En todos los casos cuando se fija una mutante de Cyt1Aa la unión con Cry4Ba se ve reducida. De igual manera, la unión de Cry4Ba mutante contra Cyt1Aa silvestre es menor que la unión entre proteínas silvestres. Además, la unión de una mutante en Cyt1Aa y una mutante en el asa  $\alpha 8$  del dominio II de Cry4Ba muestra la mayor reducción de señal con respecto a las toxinas silvestres. Estos resultados muestran una correlación en reducción de sinergismo con una reducción en unión entre las toxinas como fue el efecto observado con Cry11Aa. Si Cyt1Aa también genera sinergismo con las toxinas Cry4Aa a través de una interacción física podemos concluir que el mecanismo de receptor propuesto para Cry11Aa es compartido entre las toxinas Cry de *Bti* y no es específica de sólo una pareja de proteínas.



**Figura 8.24. Ensayos de unión diferencial entre Cyt1Aa y Cry4Ba por ELISA.** La placa fue cubierta con 250 ng de Cyt1Aa o sus mutantes por pozo. Estos pozos fueron incubados con 75 nM de Cry4Ba o la mutante  $\alpha 8M2$ . Los valores de absorbancia a 490 nm están mostrados como porcentaje de unión en comparación a las toxinas silvestres. “wt” denota Cry4Ba silvestre y “wt2” a Cyt1Aa silvestre.

## 9. DISCUSIÓN

La toxina Cyt1Aa es una proteína con alto potencial biotecnológico. Aunque se ha usado en combinación con las demás toxinas producidas por *Bacillus thuringiensis israelensis* en preparaciones comerciales, el conocimiento de las bases bioquímicas de su actividad tóxica y sinérgica permite el diseño de variantes con un objetivo en particular. Ahora se tiene más conocimiento de qué regiones de la toxina actúan para sinergizar a las toxinas Cry de *Bti* pero la actividad individual de Cyt1Aa no está completamente elucidada. El proyecto presentando aquí buscó determinar que tan específicas eran las interacciones de Cyt1Aa con membranas intestinales de diferentes insectos y con distintas toxinas Cry de *Bti* y así intentar explicar el porqué de los efectos de toxicidad y sinergia observados *in vivo*. Ambos conocimientos nos abren a una utilización más inteligente de las formulaciones de *Bt*. El potencial de Cyt1Aa para el combate y retraso a la generación de poblaciones resistentes de insectos tiene repercusiones importantes sobre el futuro de *Bacillus thuringiensis* para el control biológico [61].

La investigación sobre el mecanismo de acción se empezó desde el primer paso: la solubilización. Una diferencia en la forma que Cyt1Aa se solubilizara en el intestino de un insecto sensible contra uno no sensible sería un gran impedimento para la búsqueda de variantes con especificidad alterada ya que potencialmente involucraría cambiar el punto isoeléctrico de la proteína y quizá buscar formas diferentes de agregación que se pudieran disociar en un ambiente intestinal distinto. Los resultados en la curva de solubilización indican que este no es el caso entre lepidópteros y dípteros, y también se observa por los trabajos de Souza-Neto [53] y Dow [54]. Ambos órdenes de insectos comparten la característica de tener ambientes intestinales con un pH alcalino cercano o superior a 10 y la presencia de agentes reductores. El potencial uso de Cyt1Aa para el control de plagas de coleópteros no parecería gozar de la misma ventaja ya que este orden de insectos presenta un ambiente intestinal de pH ácido. Por otro lado aunque Cyt1Aa se ha reportado tener toxicidad cerca de 70 veces menor a Cry3A contra el coleóptero *Chrysomela scripta* la toxicidad aumenta a sólo 2.8 veces menor cuando se solubiliza Cyt1Aa en una solución alcalina primero [62]. Cabe destacar que este paso



previo de alcalinización no se presentaría en el tracto intestinal del coleóptero. La similitud en ambientes intestinales entre dípteros y lepidópteros permite suponer que si el insecto ingiriese un cristal de la toxina Cyt1Aa éste sería capaz de disociarse a protoxinas monoméricas. Con esta información se concluyó que no es en el paso de solubilización donde radica la especificidad de la toxina.

El siguiente punto de posible diferencia era durante el procesamiento de la toxina hacia su forma activa. Se propone que la pérdida de los extremos amino y carboxilo terminal de la protoxina permiten a la toxina proseguir con los cambios necesarios para llegar eventualmente a disrupción de la membrana de células epiteliales intestinales. Un insecto no sensible podría poseer entre la batería de proteasas de su intestino alguna combinación de enzimas que degradasen Cyt1Aa y así escapar de la acción de la toxina. Se observó que Cyt1Aa no sólo era resistente a degradación por el jugo gástrico de *Manduca sexta* sino que se activaba a un fragmento del tamaño esperado y que era capaz de agregarse en membranas como la toxina activada de forma rutinaria en presencia de membranas sintéticas. Esta información permite concluir que Cyt1Aa es capaz de solubilizarse y procesarse hacia una forma activa en el intestino del insecto no sensible *Manduca sexta*.

A la fecha no se ha reportado que la interacción de las toxinas Cyt con membranas dependa de la presencia de algún receptor de carácter proteico. La asociación parece estar mediada únicamente por los lípidos que constituyen la bicapa. Dado que Cyt1Aa sería capaz de solubilizarse y activarse en el lumen intestinal de un insecto no sensible al igual que en un insecto sensible, especulamos que la especificidad dependía de algún componente de la membrana y, por la información previa existente, este(os) componente(s) sería(n) de naturaleza lipídica. Los resultados de la unión de Cyt1Aa a VMMA con incubaciones a diferente pH, en competencia con excesos de sí misma, y en la curva de unión competitiva, todos indican que el fragmento activado de Cyt1Aa se une de forma muy parecida a las membranas del insecto sensible *Aedes aegypti* y a las del insecto no sensible *Manduca sexta* en el rango de pH que podría observarse en el intestino de estos organismos. Los experimentos de competencia sugieren que a altas concentraciones de la toxina comienza a haber una diferencia entre los dos insectos donde la toxina se retiene más en membranas de *Aedes aegypti*. Este dato también se llegó a observar en las curvas de unión competitiva cuando se usaban concentraciones

$\mu\text{M}$  de toxina. Aunque la afinidad de Cyt1Aa en *Manduca sexta* sea similar a *Aedes aegypti*, el hecho de que la toxina muestre una mayor facilidad de competencia en *M. sexta* indica que sí existe una diferencia en la forma en que la proteína está interactuando con las membranas. Esto podría ser suficiente para que Cyt1Aa sea incapaz de llegar a una concentración letal efectiva en el insecto no sensible. Estos datos indican un camino a seguir para resolver el porqué la diferencia drástica en toxicidad en diferentes insectos. Es claro que la unión de Cyt1Aa entra en una etapa de interacciones no electrostáticas una vez que se encuentra en la membrana que en general no se ve afectada por la presencia de biotina sobre las lisinas o por el cambio del pH exterior para *Aedes aegypti*. Para *Manduca sexta* el pH ácido reduce la unión lo que sugiere mayor dependencia a interacciones electrostáticas que se eliminan en el pI de la toxina. En ambos casos la proteína unida a VMMA es una fracción de la toxina a la que son expuestas las membranas, algo que podría indicar porqué la concentración necesaria para obtener letalidad por Cyt1Aa en los insectos blancos es más alta que aquella requerida para las toxinas Cry de *Bti*. La unión no dependiente de pH también explica porque se puede observar toxicidad por Cyt1Aa activada en insectos con un ambiente intestinal tan diferente como coleópteros y dípteros. Aunque la unión a *Manduca sexta* se vea reducida a pH ácido es posible que en coleópteros sensibles la composición lipídica de sus membranas permita mayor interacción hidrofóbica. La importancia de esta unión hidrofóbica se añade a la evidencia de que es el dominio C-terminal el que está mediando esta la unión a la membrana ya que es aquél con mayor posibilidad de llevar a cabo interacciones de esta naturaleza. En estudios con la proteína volvatoxina A2 se observó que el dominio C-terminal era aquél involucrado en inserción de la toxina en membranas [57], con quien comparte un plegado tridimensional casi idéntico con las toxinas Cyt, y se ha observado este mismo comportamiento con Cyt1Aa [56].

En experimentos previos llevados a cabo en el laboratorio se observó que Cyt1Aa marcada en C190 con 1,5-IAEDANS retenía actividad hemolítica (datos no publicados). Es esperado que con otros fluoróforos de tamaño similar al 1,5-IAEDANS también se retenga la función de la toxina y esto permitió usar el fluoróforo Alexa-350 sin muchas reservas. En Cyt2Aa incluso se ha marcado una posición equivalente con un fluoróforo más grande, el acrilodan, reteniendo también la función hemolítica. Todo esto sugiere que este residuo no es crítico para la estructuración y función de la proteína y que se podría mutar C190 si se buscara generar un sitio alternativo para marcaje único en tiol

en Cyt1Aa. El procedimiento de activación, purificación, marcaje y limpieza ya fue establecido de manera eficiente en el transcurso de este proyecto y sólo se requeriría de la elaboración de las mutantes por PCR de mutagénesis sitio dirigida.

El ligero corrimiento a azul de Cyt1Aa-Alexa 350 cuando la toxina fue incubada con VMMA aunado al pequeño corrimiento al rojo del pico de emisión de triptófano (reportado de 335 nm a 337-340 nm por Butko [21] ) indican que sí hay un cambio a un ambiente menos polar circundante a la cisteína C190 una vez que la toxina interactúa con membranas nativas (lo cual ocurre de forma parecida para Cyt2Aa con membranas sintéticas [24]) y que los triptófanos permanecen accesibles al solvente. La reducción en accesibilidad de C190 se validó por las curvas de apagamiento con KI, aunque este cambio resultó ser idéntico independientemente del insecto desde el cual se derivaron las membranas intestinales utilizadas. Evidentemente el estudio de un solo residuo de la toxina es incapaz de determinar la conformación global de la proteína. Por esta razón se tienen que analizar otras regiones de la toxina de forma similar a lo realizado con C190, validando los cambios de polaridad con apagamiento en VMMA. El uso de liposomas podría resultar conveniente para analizar las distancias entre el fluoróforo en diferentes posiciones de la toxina y los triptófanos W154 y W157 de Cyt1Aa debido a que Alexa-350 permite transferencia por el fenómeno de FRET desde estos aminoácidos.

Utilizando una estrategia para disociar interacciones inespecíficas se buscó discriminar la interacción del fago M13 con la fusión Cyt1Aa-P3 con VMMA de *Aedes aegypti* y *Manduca sexta*. Por medio de Western Blot se ha podido confirmar que el fagémido con las construcciones introducidas y las condiciones establecidas permiten un despliegue de la protoxina en este sistema con un buen título viral. Se observó que sólo cuando la incubación tenía la cinética de asociación lenta a 4 °C y después una temperatura permisiva a inserción (30 °C) [18] era posible detectar una asociación mayor de viriones fusión a vesículas de *Aedes aegypti* sobre *Manduca sexta*. A diferencia de los estudios con toxina libre la protoxina fusionada al fago sí permitió observar una diferencia de asociación de Cyt1Aa a las membranas, aun cuando fuese sólo tres veces mayor. Se debe reiterar que el contexto de la proteína en fusión al fago es diferente de la toxina libre y quizá en esto radique la posibilidad de ver esta diferencia. El fago podría estar provocando que asociaciones débiles sean incapaces de mantener el complejo VMMA-Cyt1Aa-fago y entonces se magnifique el efecto proporcionado por interacciones

fuertes, posiblemente aquellas de las cuáles depende la especificidad de la toxina. En cualquier caso, las condiciones de incubación obtenidas permiten detectar mayor unión de Cyt1Aa a vesículas a *Aedes aegypti* que a *Manduca sexta* cuando se encuentra en el contexto del fago, y así se sientan las bases para refinar el protocolo buscando incrementar esta diferencia. Esto apunta a que sería posible hacer tamizajes de bibliotecas de variantes de Cyt1Aa hasta encontrar aquellas que aumentaran su retención en vesículas de *Manduca sexta*.

Esta vertiente del trabajo se inició con miras a identificar la naturaleza bioquímica de la especificidad de Cyt1Aa utilizando como comparación un insecto sensible a la toxina y otro no sensible. Se buscó analizar paso a paso el mecanismo de acción propuesto para detectar algún punto de distinción entre los dos insectos. Observamos que tanto en experimentos de competencia como cuando se utiliza la protoxina de Cyt1Aa en fusión del fago M13 la unión a VMMA de *Aedes aegypti* es más fuerte que aquella en VMMA de *Manduca sexta*. No hay estudios donde se haya estudiado la concentración de Cyt1Aa en el lumen intestinal durante una intoxicación letal. Es posible que la acción letal de Cyt1Aa requiera superar un umbral de concentración antes de que la unión basal a lípidos sea superada por otras fuerzas adicionales que fortalecen la unión y confieren especificidad. Los estudios en eritrocitos [18] y en tubos de Malpigio [19] indican que se requiere acumulación de monómeros antes de ver actividad de lisis por la toxina y que la actividad depende de la temperatura (y por consiguiente de la fluidez de la membrana). Considerando esto se podría pensar que en un insecto sensible la toxina no llega a la concentración crítica de monómeros en la membrana y de ahí que no se desencadene un proceso de destrucción celular. Esto podría ser un equilibrio entre las propiedades de afinidad y sus cambios conformacionales y la capacidad de la célula de eliminar la toxina de su superficie. También podría deberse a que la composición membranal del insecto no sensible lleve a un fluidez membranal no permisiva para la agregación funcional de la toxina. Las células no permanecen pasivas ante el ataque de las toxinas sino que responden al daño en sus membranas. Recientemente se observó que tanto *Aedes aegypti* como *Manduca sexta* dependen de p38 para la defensa ante la acción de Cry11Aa y Cry1Ab, respectivamente [63]. Una diferencia observada es que la respuesta de p38 de *M. sexta* es mayor dado que los niveles basales de p38 fosforilado son menores. Esto significa que ante un estrés de una toxina similar y un mecanismo compartido las células de los dos insectos no responden exactamente de la misma

forma. Entonces, pensando en Cyt1Aa, es posible que las células del intestino de un insecto sensible no monten una respuesta de defensa tan eficiente como aquella de un insecto no sensible, y que este proceso permita que se llegue a la concentración crítica de Cyt1Aa en la membrana para llevar a cabo su acción tóxica. También es posible que existan cascadas de señalización adicionales en las células de los insectos sensibles que promuevan muerte celular en mayor grado que en el tejido de un insecto no sensible.

Adicionalmente, siempre se ha considerado al fragmento activo de las toxinas Cyt a aquél que queda después de la activación por proteasas intestinales. Esto es cierto en cuanto a que este fragmento es capaz de insertarse y destruir membranas. Los fragmentos removidos se han considerado como sólo necesarios para estructuración y acumulación en cristales. En vista de los resultados de este trabajo es posible que el fragmento activado ya no posea los determinantes de especificidad de la protoxina y por esta razón sea capaz de unirse a una variedad de membranas *in vitro* ([16],[64]). Es posible que el orden de los pasos del mecanismo de acción no sea estrictamente el propuesto sino que primero reconozca alguna molécula de las membranas blanco por algún epítipo de la protoxina. Debido a que no se ha registrado un receptor proteico esta molécula podría ser algún tipo de carbohidrato solamente presente en insectos sensibles. Por ejemplo, la unión de Cry1Ac a sus receptores depende de la presencia de N-galactosamina [65]. Una vez que la protoxina se ha adherido a la membrana entonces sufre cortes por proteasas ya sea provenientes del jugo intestinal o ancladas a la membrana. El proceso incluso podría ser simultáneo. Después de esto la toxina prosigue con su inserción y asociación para formar poros. Por esta razón sería pertinente realizar estudios de unión con protoxina solubilizada en vez de utilizar el fragmento activado. La especificidad dependiente de la protoxina podría tener sentido en vista de los resultados con despliegue en fagos.

En lo concierne a la especificidad de interacciones de Cyt1Aa con toxinas Cry de *Bti* se evaluó tanto el efecto *in vivo* sobre sinergia de mutantes tanto en Cyt1Aa contra Cry4Ba y Cry4Aa así como la relación con la unión de las proteínas por medio de ELISA. Los resultados mostraron que las mutantes de Cyt1Aa en los epítipos de interacción con Cry11Aa podían disminuir la sinergia contra *Aedes aegypti* tanto con Cry4Ba como Cry4Aa. De igual forma, una mutante en el asa  $\alpha 8$  de Cry4Ba, una de las regiones involucradas en su contacto con receptores en la membrana celular, también disminuía

el efecto sinérgico. La combinación de mutantes en ambas proteínas tenía un efecto de disminución adicional que la mutante de Cry4Ba por sí sola. Se observó también que la disminución en sinergia con Cry4Ba correlacionaba con una disminución en unión de las toxinas, evaluado tanto por métodos de ELISA como ligand blot. La evidencia apunta a que el mecanismo de sinergia por Cyt1Aa donde actúa como receptor de Cry11Aa es compartido con Cry4Ba y con Cry4Aa.

La existencia de tal mecanismo compartido con todas las toxinas del cristal que produce *Bacillus thuringiensis israelensis* nos ayuda a entender aún más el porqué de la efectividad de preparaciones de esta bacteria para el control biológico de mosquitos y el porqué de la ausencia de poblaciones resistentes a pesar de su amplio uso por muchos años. Además de la letalidad individual de las toxinas la presencia de un receptor adicional para las proteínas que lo requieren genera una combinación al parecer ineludible. Dado que tanto a Cry11Aa, Cry4Ba y Cry4Aa podrían compartir receptores en la membrana y tienen regiones similares de contacto con ellos ([38], [66], [42], [40], [39]) la generación de mutantes de esas proteínas afectaría negativamente de forma simultánea la toxicidad de todas ellas. La presencia de Cyt1Aa evita que la población de insectos pueda escapar a la toxicidad de cualquiera de ellas incluso cuando por sí misma no llegara a una concentración altamente tóxica. Aún queda por resolver cómo es que proteínas que difieren a nivel de secuencia y de manera particular en las asas por las cuáles contactan a sus receptores puedan compartir la interacción en un sitio sobre Cyt1Aa. La clave puede radicar en la estructura tridimensional compartida de las toxinas donde a pesar de una divergencia en aminoácidos se pudiera conformar una interfase o motivo tridimensional parecido que contactara a Cyt1Aa en las mismas regiones. Las diferencias entre las toxinas Cry podría explicar porqué algunas mutantes de Cyt1Aa no muestran el mismo efecto sobre el sinergismo y unión. Por ejemplo, la mutante Cyt1Aa K225A no tiene efecto sobre el sinergismo con Cry4Aa pero reduce el sinergismo con Cry4Ba y Cry11Aa. Sería provechoso investigar las similitudes y diferencias en las estructuras de la región  $\alpha 8$  o todo el dominio II de Cry11Aa, Cry4Ba y Cry4Aa y su complementación con las regiones de contacto en Cyt1Aa. La comparación de estos motivos o interfases con toxinas Cry que Cyt1Aa es incapaz de sinergizar o unir como Cry1Ab ([12], [32]) resultaría de mucho interés.

Una idea que surge de observar la especificidad de Cyt1Aa individual y en su interacción con toxinas Cry es que el papel más importante de Cyt1Aa es servir como receptor y no como agente letal individual. Existen algunos datos que permiten especular que la función inicial de Cyt1Aa no era ser tóxica y de aquí que no importara que su toxicidad individual fuese menor que las toxinas Cry producidas en paralelo por *Bti*. El efecto citolítico de Cyt1Aa podría haber evolucionado por la capacidad inherente de unión e inserción sin dependencia de proteínas. Por ejemplo, la toxicidad de Cyt1Aa se observa en concentraciones mucho más elevadas que aquellas necesarias para que sinergice y también parecer depender de la acumulación de monómeros en un mismo sitio ya que no difunde lateralmente una vez en la membrana [18]. Esto indica que a medida que se libera toxina al intestino primero ocurriría la sinergia y más adelante la toxicidad individual. Su papel más importante como plataforma para las toxinas Cry que como agente tóxico explicaría porque la capacidad de unión a muchos tipos de membranas (como se observó con resultados en las VMMA de *Manduca sexta* y *Aedes aegypti* en este trabajo y anteriormente en [16]) aparenta ser más prolífica y menos específica *in vitro*. En estos experimentos se podría estar llevando a la toxina a situaciones artificiales donde se favorece en gran medida su unión a membranas y consecuentemente se acarrea un efecto lítico. También se puede destacar que la proteína volvatoxina A2 del hongo *Volvariella volvacea* posee un dominio de unión a heparina en las regiones donde no comparte plegado similar a toxinas Cyt [67]. Este dominio podría jugar el papel de darle mayor especificidad de anclaje y hacer más eficiente la acumulación de monómeros para desempeñar el papel tóxico. Adicionalmente, la proteína volvatoxina A1 es una repetición en tándem de la volvatoxina A2, que carece de dominios de unión a heparina y que además no es tóxica. Es capaz de unirse a la volvatoxina A2 e inhibir su efecto citolítico [68] lo que sugiere que la asociación de proteínas parecidas a Cyt1Aa no siempre conduce a un oligómero tóxico. Por otro lado, la proteína Evf de *Erwinia carotovora* presenta en su dominio C-terminal una topología tridimensional muy similar a toxinas Cyt y a la volvatoxina A2 [69]. El papel de esta proteína no es tóxico sino que permite el anclaje de esa bacteria a las células epiteliales intestinales de *Drosophila melanogaster* y favorece su persistencia y transmisión. En su caso, la proteína Evf permite este anclaje mediante la formación de una cavidad que une covalentemente al ácido palmítico de los lípidos de membrana. Genes parecidos a Cyt fueron encontrados en la bacteria *Dickeya dadantii* y al parecer también tienen un papel en facilitar la colonización del tracto intestinal de áfidos aunque su papel como factores

letales es desconocido [70] . Finalmente, se observó que la propia toxina Cyt1Aa no resultaba tóxica contra el mosquito *Anopheles albimanus* y sin embargo era capaz de sinergizar a las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba contra este insecto [71]. Todo esto apunta evolutivamente a que la estructura de las toxinas Cyt tenía como función original la unión e inserción en membrana de la proteína y que el efecto tóxico se desarrolló posteriormente. Posiblemente la cepa inicial no poseía toxinas Cyt como sucede con otras variedades de *Bt* y ésta fue adquirida en algún evento de transferencia horizontal. Llevando esto un poco más lejos es posible que inicialmente sólo fuera capaz de unir a una de las proteínas Cry de *Bti* y posteriormente por presión selectiva se evolucionara a que todas ellas compartieran sitios de unión con Cyt1Aa debido al efecto potencializador de su toxicidad y un mayor éxito de letalidad.



## 10. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se mostró que en los ensayos *in vitro* de solubilización, activación, oligomerización en liposomas, unión a membranas de la microvellosidad apical y afinidad por dichas membranas para la proteína Cyt1Aa activada no se ha podido detectar una diferencia bioquímica que explique la especificidad de la toxina *in vivo* contra los insectos usados de modelo. Aún así, se observó que es más fácil competir Cyt1Aa en las membranas de *M. sexta* y que en el contexto del fago M13 la protoxina presenta mayor unión a vesículas de *A. aegypti*. Esto podría explicar hasta cierto grado que la toxina no se acumule a un nivel suficiente para superar un umbral para iniciar su proceso tóxico. Esto también indica que la técnica de despliegue en fagos puede ser útil para futuros usos con biopanning con bibliotecas de variantes de Cyt1Aa, ya sea para encontrar variantes que unan toxinas Cry de cepas diferentes a *Bti* o para recuperar fagos con mayor retención en membranas de *Manduca sexta* que a *Aedes aegypti*.

Finalmente, se pudo demostrar que los mismos sitios de Cyt1Aa que interactúan y ayudan al sinergismo con Cry11Aa están involucrados en el sinergismo y unión con las toxinas Cry4Ba y Cry4Aa, especialmente el epítipo que contiene a Glu204. La toxina Cry4Ba también une a Cyt1Aa a través del asa  $\alpha 8$  del dominio II. De esta forma se concluye que el mecanismo de sinergismo al servir de receptor auxiliar reportado entre Cyt1Aa y Cry11Aa es compartido con las otras toxinas Cry producidas por *Bti*. La especificidad de interacciones con toxinas Cry mostrada por Cyt1Aa comparada con su mayor inespecificidad en como interactúa con membranas apunta a que el papel más importante de la toxina Cyt1Aa es aquél donde sinergiza y no donde actúa como toxina independiente.

## 11. PERSPECTIVAS

El trabajo realizado hasta el momento en este proyecto ha permitido entender un poco mejor los procesos de toxicidad y sinergia de Cyt1Aa. Aunque la evidencia sugiere que la especificidad en toxicidad individual radica en la forma en que Cyt1Aa se acumula en la membrana aún falta información para poder afirmar esto de forma contundente. Para esto se está buscando avanzar en el uso de Cyt1Aa marcada fluorescentemente en incubación con VMMA de *Aedes aegypti* y *Manduca sexta* para su análisis por FRET y ensayos de apagamiento de fluorescencia. Además de los apagadores solubles se deben completar los experimentos utilizando apagadores lipídicos que ayudarían a determinar la profundidad de la penetración de los residuos de la toxina en la bicapa de la membrana [72].

Es claro que para realizar un mapa de la conformación adoptada por Cyt1Aa en liposomas, y quizá incluso en VMMA, es necesario hacer más mediciones moleculares a través de la técnica de FRET y utilizar esta técnica para establecer distancias en esta conformación como se ha realizado anteriormente [73]. Para poder tener un sitio único de marcaje en cisteína en otras partes de la toxina activada se deberá mutar C190. En Cyt2Aa el residuo correspondiente es leucina, que mantiene una cadena lateral no cargada y relativamente corta. El fondo genético Cyt1Aa C190L permitiría entonces buscar otros sitios para introducir un cisteína. Algunos residuos que permitirían elucidar ciertas distancias y posiciones de interés son los siguientes:

- K124C, que se ubicaría en la hélice  $\alpha C$ , y que se sabe que se expresa, es tóxica y se une a liposomas.[74] Esta región en principio quedaría desplegada sobre la membrana. Esta región se alejaría de los triptófanos en modelo de sombrilla.
- E204C, ubicado en el epítipo de sinergia con Cry11Aa en  $\alpha E$ , que se expresa y es tóxica [32]. Esta región también quedaría expuesta al exterior de la membrana pero sin desplazarse a gran distancia de los triptófanos.
- L224C, ubicada en la hebra  $\beta 7$ , y que se encuentra dentro del otro epítipo de sinergia con Cry11Aa. La posición equivalente en Cyt2Aa se ha podido mutar a cisteína y obtener una proteína marcada que es tóxica [24]. Este

residuo debería penetrar en la membrana pero no cambiar demasiado su distancia hacia los triptófanos (como en el caso de C190).

Éstas son las mutantes que se propondrían de inicio y que permitirían un análisis más detallado de diferentes regiones de la toxina. Haría falta encontrar algún residuo en  $\alpha$ B o  $\alpha$ A de Cyt1Aa que pudiera ser mutado sin abatir la función de la proteína para indagar como se ubica este hairpin al interaccionar con membranas.

En cuanto a estudios de otros pasos del mecanismo de acción se proponen los siguientes experimentos que no se han realizado:

- Análisis de la formación de poro en VMMA de *Aedes aegypti* o *Manduca sexta* detectado por la liberación de calceína al agregar toxina o protoxina de Cyt1Aa. Esto indicaría no sólo si en ambas tipos de membrana es funcional la toxina sino también a qué concentración comienza a ocurrir un efecto lítico.
- Análisis de competencia y afinidad de la protoxina por VMMA de ambos insectos. Esto es para determinar si existe algún determinante de especificidad que se pierde durante el procesamiento al fragmento activo.

No se sabe si Cyt1Aa se une a las células epiteliales del intestino de *Manduca sexta in vivo* o si la toxina pasa por el tracto digestivo y es excretada. Se han hecho estudios de inmunolocalización de Cyt1Aa en cortes de intestinos de mosquito. Un estudio similar se podría hacer con intestinos de *Manduca sexta* y observar si la unión observada *in vitro* es un artefacto o refleja un evento natural. Esto además permitiría enfocar más estudios de especificidad al evento de unión. Si se observa que la toxina se une entonces tendría que analizarse con más detalle los efectos de la toxina en la membrana y viceversa. Si no, entonces se sabe que la especificidad radica en un paso anterior. Hay que recordar que una posibilidad de la no sensibilidad de *Manduca sexta* ante Cyt1Aa es que exista una respuesta celular diferente ante la toxina. Para abordar esta posibilidad se podrían realizar estudios de proteómica o transcriptómica en ambos insectos para detectar si existe una respuesta global similar o no, o podría uno enfocarse a estudiar una vía más específica como sería p38 y ver si su inducción sigue patrones equivalentes o no.

Los experimentos de despliegue de fagos indican que con futuro refinamiento del protocolo se podrían establecer condiciones para un eficiente biopanning de mutantes de Cyt1Aa que incrementaran su afinidad por VMMA de *Manduca sexta*. En estos experimentos se buscaría generar bibliotecas con diferentes tasas de mutagénesis y en diferentes segmentos de la proteína. Una búsqueda general se haría con bibliotecas de una tasa media de mutagénesis en Cyt1Aa [75], para abarcar la extensión completa de la toxina activada en búsqueda de mutantes. Por otra parte, el trabajo de C. Rodríguez en el laboratorio indica que el dominio C-terminal, al igual que en la volvatoxina A2, es el responsable de la interacción de Cyt1Aa con membranas, mientras que el dominio N-terminal está involucrado en oligomerización. Por esta razón se buscaría diseñar una biblioteca de mutagénesis media sólo sobre el dominio C-terminal en búsqueda de mutantes que incrementaran su afinidad por la VMMA de *Manduca sexta* en las condiciones establecidas para el biopanning.

Un objetivo adicional sería seguir con los estudios de fluorescencia de Cyt1Aa pero buscando saber cómo se modifica la membrana bajo la acción de la toxina. Esto se podría hacer con lípidos cuya fluorescencia cambie con la fluidez de la membrana. Si el mecanismo de detergente fuera el adecuado uno esperaría que la fluidez de la membrana aumentara cuando se desorganizan los lípidos de la bicapa. En un mecanismo de poro la fluidez de la membrana permanecería similar al estado sin toxina. Por medio de microscopía de fluorescencia en bicapas se podría incluso llegar a observar si Cyt1Aa marcada fluorescentemente co-localizaría con sitios de fluidez alterada en las membranas. Estos experimentos, realizados con diferentes concentraciones de toxina, podrían no sólo determinar si hay un momento de transición entre el mecanismo de lisis dependiente de concentración de toxina, sino incluso aventurarse a determinar la estructura del oligómero de Cyt1Aa en las membranas.

En cuanto a los experimentos de sinergia quedan algunos puntos por hacer. Por ejemplo, se necesitará crear mutantes en Cry4Aa en puntos del asa  $\alpha 8$  del dominio II y probar de forma similar su efecto con sinergia y su unión directamente con Cyt1Aa por ensayos de ELISA. Esto redondearía el panel de ensayos sobre el efecto de las mutantes en estas regiones sobre el efecto de sinergismo. Por otra parte, dado que otras aspas del dominio II también se han detectado que están involucrados en el contacto con receptores en insectos se tendrán que hacer mutantes en esas regiones y de igual manera indagar sobre

su efecto en sinergismo. Esto nos diría si la interacción de las toxinas Cry y Cyt1Aa se limita al  $\alpha 8$  u otros sitios de estas toxinas pueden contactar a Cyt1Aa. De igual manera, a pesar de lo que se observó con los ensayos de PepSpot [32] se podrían hacer otras mutaciones en Cyt1Aa que reduzcan unión en ELISA y después investigar si estas mutantes también reducen el efecto sinérgico. Para eso podría utilizarse una biblioteca de variantes de Cyt1Aa para despliegue en fagos que como se vio en este trabajo es viable utilizar.

Unos experimentos interesantes a realizar son ensayos de competencia entre las diferentes toxinas Cry de *Bti* contra Cyt1Aa. Estos nos diría si de forma global las toxinas Cry pueden desplazarse mutuamente de su interacción con Cyt1Aa. De haber competencia es posible que se explicara por qué existe una proporción mucho mayor de Cyt1Aa con respecto a las otras toxinas en los cristales de *Bti*. Al unirse a sitios compartidos se requiere un exceso de Cyt1Aa para poder sinergizar a todas las otras proteínas. De igual manera podrían hacerse ensayos de competencia entre Cyt1Aa y los receptores nativos conocidos como la fosfatasa alcalina y caderina para saber si una mutación en estos receptores podría ser suplida por una interacción con Cyt1Aa.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Huffman, D.L., L. Abrami, R. Sasik, J. Corbeil, F.G. van der Goot, and R.V. Aroian, *Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(30): p. 10995-1000.
2. Nossal, G., *Review of the Moratorium on Genetically Modified Canola in Victoria*. 2007: Melbourne.
3. Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, and D.H. Dean, *Revision of the nomenclature for the Bacillus thuringiensis pesticidal crystal proteins*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(3): p. 807-13.
4. Bravo, A., S.S. Gill, and M. Soberon, *Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control*. Toxicon, 2007. **49**(4): p. 423-35.
5. Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Puztai-Carey, J.L. Schwartz, R. Brousseau, and M. Cygler, *Bacillus thuringiensis CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation*. J Mol Biol, 1995. **254**(3): p. 447-64.
6. Gomez, I., I. Arenas, I. Benitez, J. Miranda-Rios, B. Becerril, R. Grande, J.C. Almagro, A. Bravo, and M. Soberon, *Specific epitopes of domains II and III of Bacillus thuringiensis CryIAb toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in Manduca sexta*. J Biol Chem, 2006. **281**(45): p. 34032-9.
7. de Maagd, R.A., P.L. Bakker, L. Masson, M.J. Adang, S. Sangadala, W. Stiekema, and D. Bosch, *Domain III of the Bacillus thuringiensis delta-endotoxin CryIAc is involved in binding to Manduca sexta brush border membranes and to its purified aminopeptidase N*. Mol Microbiol, 1999. **31**(2): p. 463-71.
8. Pacheco, S., I. Gomez, I. Arenas, G. Saab-Rincon, C. Rodriguez-Almazan, S.S. Gill, A. Bravo, and M. Soberon, *Domain II loop 3 of Bacillus thuringiensis CryIAb toxin is involved in a "ping pong" binding mechanism with Manduca sexta aminopeptidase-N and cadherin receptors*. J Biol Chem, 2009. **284**(47): p. 32750-7.
9. Guerchicoff, A., A. Delecluse, and C.P. Rubinstein, *The Bacillus thuringiensis cyt genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(3): p. 1090-6.
10. Li, J., P.A. Koni, and D.J. Ellar, *Structure of the mosquitocidal delta-endotoxin CytB from Bacillus thuringiensis sp. kyushuensis and implications for membrane pore formation*. J Mol Biol, 1996. **257**(1): p. 129-52.
11. Mora, R., J.E. Ibarra, and A.M. Espinoza, *A reliable bioassay procedure to evaluate per os toxicity of Bacillus thuringiensis strains against the rice delphacid, Tagosodes orizicolus (Homoptera: Delphacidae)*. Rev Biol Trop, 2007. **55**(2): p. 373-83.
12. Meyer, S.K., B.E. Tabashnik, Y.B. Liu, M.C. Wirth, and B.A. Federici, *CytIA from Bacillus thuringiensis lacks toxicity to susceptible and resistant larvae of diamondback moth (Plutella xylostella) and pink bollworm (Pectinophora gossypiella)*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(1): p. 462-3.
13. Fernandez, L.E., K.G. Aimanova, S.S. Gill, A. Bravo, and M. Soberon, *A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of CryIIAa toxin in Aedes aegypti larvae*. Biochem J, 2006. **394**(Pt 1): p. 77-84.

14. Crickmore, N., E.J. Bone, J.A. Williams, and D.J. Ellar, *Contribution of the individual components of the  $\delta$ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. FEMS Microbiology Letters, 1995. **131**(3): p. 249-254.
15. Thomas, W.E. and D.J. Ellar, *Mechanism of action of Bacillus thuringiensis var israelensis insecticidal delta-endotoxin*. FEBS Lett, 1983. **154**(2): p. 362-8.
16. Thomas, W.E. and D.J. Ellar, *Bacillus thuringiensis var israelensis crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo*. J Cell Sci, 1983. **60**: p. 181-97.
17. Butko, P., F. Huang, M. Pusztai-Carey, and W.K. Surewicz, *Membrane permeabilization induced by cytolytic delta-endotoxin CytA from Bacillus thuringiensis var. israelensis*. Biochemistry, 1996. **35**(35): p. 11355-60.
18. Promdonkoy, B. and D.J. Ellar, *Investigation of the pore-forming mechanism of a cytolytic delta-endotoxin from Bacillus thuringiensis*. Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): p. 255-9.
19. Maddrell, S.H., N.J. Lane, J.B. Harrison, J.A. Overton, and R.B. Moreton, *The initial stages in the action of an insecticidal delta-endotoxin of Bacillus thuringiensis var. israelensis on the epithelial cells of the malpighian tubules of the insect, Rhodnius prolixus*. J Cell Sci, 1988. **90** ( Pt 1): p. 131-44.
20. Koni, P.A. and D.J. Ellar, *Cloning and characterization of a novel Bacillus thuringiensis cytolytic delta-endotoxin*. J Mol Biol, 1993. **229**(2): p. 319-27.
21. Butko, P., F. Huang, M. Pusztai-Carey, and W.K. Surewicz, *Interaction of the delta-endotoxin CytA from Bacillus thuringiensis var. israelensis with lipid membranes*. Biochemistry, 1997. **36**(42): p. 12862-8.
22. Butko, P., *Cytolytic toxin CytIA and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(5): p. 2415-22.
23. Promdonkoy, B., W. Pathaichindachote, C. Krittanai, M. Audtho, N. Chewawiwat, and S. Panyim, *Trp132, Trp154, and Trp157 are essential for folding and activity of a Cyt toxin from Bacillus thuringiensis*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **317**(3): p. 744-8.
24. Promdonkoy, B. and D.J. Ellar, *Membrane pore architecture of a cytolytic toxin from Bacillus thuringiensis*. Biochem J, 2000. **350** Pt 1: p. 275-82.
25. Du, J., B.H. Knowles, J. Li, and D.J. Ellar, *Biochemical characterization of Bacillus thuringiensis cytolytic toxins in association with a phospholipid bilayer*. Biochem J, 1999. **338** ( Pt 1): p. 185-93.
26. Wu, D. and F.N. Chang, *Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from Bacillus thuringiensis subsp. israelensis crystal*. FEBS Letters, 1985. **190**(2): p. 232-236.
27. Georghiou, G.P. and M.C. Wirth, *Influence of Exposure to Single versus Multiple Toxins of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis on Development of Resistance in the Mosquito Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae)*. Appl Environ Microbiol, 1997. **63**(3): p. 1095-1101.
28. Wirth, M.C., G.P. Georghiou, and B.A. Federici, *CytA enables CryIV endotoxins of Bacillus thuringiensis to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, Culex quinquefasciatus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10536-40.
29. Wirth, M.C., H.W. Park, W.E. Walton, and B.A. Federici, *CytIA of Bacillus thuringiensis delays evolution of resistance to CryIIA in the mosquito Culex quinquefasciatus*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(1): p. 185-9.

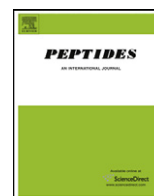
30. Wirth, M.C., B.A. Federici, and W.E. Walton, *Cyt1A from Bacillus thuringiensis synergizes activity of Bacillus sphaericus against Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(3): p. 1093-7.
31. Wirth, M.C., A. Delecluse, and W.E. Walton, *Cyt1Ab1 and Cyt2Ba1 from Bacillus thuringiensis subsp. medellin and B. thuringiensis subsp. israelensis Synergize Bacillus sphaericus against Aedes aegypti and resistant Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae)*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(7): p. 3280-4.
32. Perez, C., L.E. Fernandez, J. Sun, J.L. Folch, S.S. Gill, M. Soberon, and A. Bravo, *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(51): p. 18303-8.
33. Perez, C., C. Munoz-Garay, L.C. Portugal, J. Sanchez, S.S. Gill, M. Soberon, and A. Bravo, *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure*. Cell Microbiol, 2007. **9**(12): p. 2931-7.
34. Chen, J., K.G. Aimanova, L.E. Fernandez, A. Bravo, M. Soberon, and S.S. Gill, *Aedes aegypti cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. Biochem J, 2009. **424**(2): p. 191-200.
35. Chen, J., K.G. Aimanova, S. Pan, and S.S. Gill, *Identification and characterization of Aedes aegypti aminopeptidase N as a putative receptor of Bacillus thuringiensis Cry11A toxin*. Insect Biochem Mol Biol, 2009. **39**(10): p. 688-96.
36. Fernandez-Luna, M.T., H. Lanz-Mendoza, S.S. Gill, A. Bravo, M. Soberon, and J. Miranda-Rios, *An alpha-amylase is a novel receptor for Bacillus thuringiensis ssp. israelensis Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito Anopheles albimanus (Diptera: Culicidae)*. Environ Microbiol. **12**(3): p. 746-57.
37. Fernandez, L.E., C. Martinez-Anaya, E. Lira, J. Chen, A. Evans, S. Hernandez-Martinez, H. Lanz-Mendoza, A. Bravo, S.S. Gill, and M. Soberon, *Cloning and epitope mapping of Cry11Aa-binding sites in the Cry11Aa-receptor alkaline phosphatase from Aedes aegypti*. Biochemistry, 2009. **48**(37): p. 8899-907.
38. Abdullah, M.A., O. Alzate, M. Mohammad, R.J. McNall, M.J. Adang, and D.H. Dean, *Introduction of Culex toxicity into Bacillus thuringiensis Cry4Ba by protein engineering*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(9): p. 5343-53.
39. Tuntitippawan, T., P. Boonserm, G. Katzenmeier, and C. Angsuthanasombat, *Targeted mutagenesis of loop residues in the receptor-binding domain of the Bacillus thuringiensis Cry4Ba toxin affects larvicidal activity*. FEMS Microbiol Lett, 2005. **242**(2): p. 325-32.
40. Khaokhiew, T., C. Angsuthanasombat, and C. Promptmas, *Correlative effect on the toxicity of three surface-exposed loops in the receptor-binding domain of the Bacillus thuringiensis Cry4Ba toxin*. FEMS Microbiol Lett, 2009. **300**(1): p. 139-45.
41. Howlader, M.T., Y. Kagawa, A. Miyakawa, A. Yamamoto, T. Taniguchi, T. Hayakawa, and H. Sakai, *Alanine scanning analyses of the three major loops in domain II of Bacillus thuringiensis mosquitoicidal toxin Cry4Aa*. Appl Environ Microbiol. **76**(3): p. 860-5.
42. Howlader, M.T., Y. Kagawa, H. Sakai, and T. Hayakawa, *Biological properties of loop-replaced mutants of Bacillus thuringiensis mosquitoicidal Cry4Aa*. J Biosci Bioeng, 2009. **108**(3): p. 179-83.



43. Boonserm, P., M. Mo, C. Angsuthanasombat, and J. Lescar, *Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from Bacillus thuringiensis at a 2.8-angstrom resolution*. J Bacteriol, 2006. **188**(9): p. 3391-401.
44. Fernandez, L.E., C. Perez, L. Segovia, M.H. Rodriguez, S.S. Gill, A. Bravo, and M. Soberon, *CryIIAa toxin from Bacillus thuringiensis binds its receptor in Aedes aegypti mosquito larvae through loop alpha-8 of domain II*. FEBS Lett, 2005. **579**(17): p. 3508-14.
45. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd Edition ed. 2006: Springer Science.
46. Pini, A., A. Giuliani, C. Ricci, Y. Runci, and L. Bracci, *Strategies for the construction and use of peptide and antibody libraries displayed on phages*. Curr Protein Pept Sci, 2004. **5**(6): p. 487-96.
47. Steiner, D., P. Forrer, M.T. Stumpp, and A. Pluckthun, *Signal sequences directing cotranslational translocation expand the range of proteins amenable to phage display*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(7): p. 823-31.
48. Soltes, G., H. Barker, K. Marmai, E. Pun, A. Yuen, and E.J. Wiersma, *A new helper phage and phagemid vector system improves viral display of antibody Fab fragments and avoids propagation of insert-less virions*. J Immunol Methods, 2003. **274**(1-2): p. 233-44.
49. Dong, L., S. Chen, U. Bartsch, and M. Schachner, *Generation of affinity matured scFv antibodies against mouse neural cell adhesion molecule L1 by phage display*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **301**(1): p. 60-70.
50. Hardy, F., L. Djavadi-Ohanian, and M.E. Goldberg, *Measurement of antibody/antigen association rate constants in solution by a method based on the enzyme-linked immunosorbent assay*. J Immunol Methods, 1997. **200**(1-2): p. 155-9.
51. Robertson, J.L., Rusell, R.M., Preisler, H., Savin, N.E., *Bioassays with Arthropods*. Second Edition ed. 2007: Taylor & Francis CRC Press.
52. Tabashnik, B.E., *Evaluation of synergism among Bacillus thuringiensis toxins*. Appl Environ Microbiol, 1992. **58**(10): p. 3343-6.
53. Souza-Neto, J.A., D.S. Gusmao, and F.J. Lemos, *Chitinolytic activities in the gut of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) larvae and their role in digestion of chitin-rich structures*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2003. **136**(3): p. 717-24.
54. Dow, J.A., *pH GRADIENTS IN LEPIDOPTERAN MIDGUT*. J Exp Biol, 1992. **172**(Pt 1): p. 355-375.
55. Escobar, E., C. Segura, M. Vanegas, M.E. Patarroyo, and S. Orduz, *Proteolytic processing of the Cyt1Ab1 toxin produced by Bacillus thuringiensis subsp. medellin*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2000. **95**(5): p. 693-700.
56. Rodriguez-Almazan, C., I. Ruiz de Escudero, P.E. Canton, C. Munoz-Garay, C. Perez, S.S. Gill, M. Soberon, and A. Bravo, *The Amino- and Carboxyl-Terminal Fragments of the Bacillus thuringiensis Cyt1Aa Toxin Have Differential Roles in Toxin Oligomerization and Pore Formation*. Biochemistry.
57. Weng, Y.P., Y.P. Lin, C.I. Hsu, and J.Y. Lin, *Functional domains of a pore-forming cardiotoxic protein, volvatoxin A2*. J Biol Chem, 2004. **279**(8): p. 6805-14.
58. Abe, Y., H. Shimada, and S. Kitada, *Raft-targeting and oligomerization of Parasporin-2, a bacillus thuringiensis crystal protein with anti-tumour activity*. J Biochem, 2008. **143**(2): p. 269-75.

59. Koni, P.A. and D.J. Ellar, *Biochemical characterization of Bacillus thuringiensis cytolytic delta-endotoxins*. Microbiology, 1994. **140** ( Pt 8): p. 1869-80.
60. Hudson, E.N. and G. Weber, *Synthesis and characterization of two fluorescent sulfhydryl reagents*. Biochemistry, 1973. **12**(21): p. 4154-61.
61. Bravo, A. and M. Soberon, *How to cope with insect resistance to Bt toxins?* Trends Biotechnol, 2008. **26**(10): p. 573-9.
62. Federici, B.A. and L.S. Bauer, *Cyt1Aa protein of bacillus thuringiensis is toxic to the cottonwood leaf beetle, chrysomela scripta, and suppresses high levels of resistance to Cry3Aa*. Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(11): p. 4368-71.
63. Cancino-Rodezno, A., C. Alexander, R. Villasenor, S. Pacheco, H. Porta, Y. Pauchet, M. Soberon, S.S. Gill, and A. Bravo, *The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from Bacillus thuringiensis*. Insect Biochem Mol Biol, 2010. **40**(1): p. 58-63.
64. Maddrell, S.H., J.A. Overton, D.J. Ellar, and B.H. Knowles, *Action of activated 27,000 Mr toxin from Bacillus thuringiensis var. israelensis on Malpighian tubules of the insect, Rhodnius prolixus*. J Cell Sci, 1989. **94** ( Pt 3): p. 601-8.
65. Burton, S.L., D.J. Ellar, J. Li, and D.J. Derbyshire, *N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised by a site on the domain III lectin-like fold of a Bacillus thuringiensis insecticidal toxin*. J Mol Biol, 1999. **287**(5): p. 1011-22.
66. Boonserm, P., P. Davis, D.J. Ellar, and J. Li, *Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications*. J Mol Biol, 2005. **348**(2): p. 363-82.
67. Lin, S.C., Y.C. Lo, J.Y. Lin, and Y.C. Liaw, *Crystal structures and electron micrographs of fungal volvatoxin A2*. J Mol Biol, 2004. **343**(2): p. 477-91.
68. Wu, P.T., S.C. Lin, C.I. Hsu, Y.C. Liaw, and J.Y. Lin, *Inhibitory effects of nontoxic protein volvatoxin A1 on pore-forming cardiotoxic protein volvatoxin A2 by interaction with amphipathic alpha-helix*. FEBS J, 2006. **273**(14): p. 3160-71.
69. Rigden, D.J., *Does distant homology with Evf reveal a lipid binding site in Bacillus thuringiensis cytolytic toxins?* FEBS Lett, 2009. **583**(10): p. 1555-60.
70. Grenier, A.M., G. Dupont, S. Pages, G. Condemine, and Y. Rahbe, *The phytopathogen Dickeya dadantii (Erwinia chrysanthemi 3937) is a pathogen of the pea aphid*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(3): p. 1956-65.
71. Fernandez-Luna, M.T., B.E. Tabashnik, H. Lanz-Mendoza, A. Bravo, M. Soberon, and J. Miranda-Rios, *Single concentration tests show synergism among Bacillus thuringiensis subsp. israelensis toxins against the malaria vector mosquito Anopheles albimanus*. J Invertebr Pathol. **104**(3): p. 231-3.
72. Bai, J., P. Wang, and E.R. Chapman, *C2A activates a cryptic Ca(2+)-triggered membrane penetration activity within the C2B domain of synaptotagmin I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1665-70.
73. Lakey, J.H., D. Baty, and F. Pattus, *Fluorescence energy transfer distance measurements using site-directed single cysteine mutants. The membrane insertion of colicin A*. J Mol Biol, 1991. **218**(3): p. 639-53.
74. Ward, E.S., D.J. Ellar, and C.N. Chilcott, *Single amino acid changes in the Bacillus thuringiensis var. israelensis delta-endotoxin affect the toxicity and expression of the protein*. J Mol Biol, 1988. **202**(3): p. 527-35.
75. Cadwell, R.C. and G.F. Joyce, *Randomization of genes by PCR mutagenesis*. PCR Methods Appl, 1992. **2**(1): p. 28-33.

**13. ANEXO: PUBLICACIÓN ORIGINAL. “BINDING OF BACILLUS THURINGIENSIS SUBSP. ISRAELENIS CRY4BA TO CYT1AA HAS AN IMPORTANT ROLE IN SYNERGISM.”**



## Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism

Pablo Emiliano Cantón<sup>a,1</sup>, Esmeralda Zanicthe Reyes<sup>a,1</sup>, Iñigo Ruiz de Escudero<sup>b</sup>, Alejandra Bravo<sup>a</sup>, Mario Soberón<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. postal 510-3, Cuernavaca 62250, Morelos, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, Campus Arrosadía, 31006 Pamplona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 April 2010

Received in revised form 7 June 2010

Accepted 7 June 2010

Available online 15 June 2010

#### Keywords:

*Bacillus thuringiensis*

Cry toxins

Cyt toxins

Synergism

### ABSTRACT

*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) produces at least four different crystal proteins that are specifically toxic to different mosquito species and that belong to two non-related family of toxins, Cry and Cyt named Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa and Cyt1Aa. Cyt1Aa enhances the activity of Cry4Aa, Cry4Ba or Cry11Aa and overcomes resistance of *Culex quinquefasciatus* populations resistant to Cry11Aa, Cry4Aa or Cry4Ba. Cyt1Aa synergized Cry11Aa by their specific interaction since single point mutants on both Cyt1Aa and Cry11Aa that affected their binding interaction affected their synergistic insecticidal activity. In this work we show that Cyt1Aa loop  $\beta 6$ - $\alpha E$  K198A, E204A and  $\beta 7$  K225A mutants affected binding and synergism with Cry4Ba. In addition, site directed mutagenesis showed that Cry4Ba domain II loop  $\alpha$ -8 is involved in binding and in synergism with Cyt1Aa since Cry4Ba SI303-304AA double mutant showed decreased binding and synergism with Cyt1Aa. These data suggest that similarly to the synergism between Cry11Aa and Cyt1Aa toxins, the Cyt1Aa also functions as a receptor for Cry4Ba explaining the mechanism of synergism between these two Bti toxins.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) is a gram-positive bacterium that produces crystal toxins during its sporulation phase that are specifically toxic to different mosquito species as *Anopheles* sp., *Aedes aegypti* and *Culex* sp. that are vectors of important human diseases as malaria, yellow and dengue fevers among others. Bti is used world wide in the control of these mosquito species, particularly in cases where resistance to chemical insecticides has developed. Despite the large use of Bti in mosquito control there are no reports of resistance to Bti in field conditions [3,19].

The lack of insect resistance development to Bti is mainly due to the fact that Bti produces at least four different crystal proteins that belong to two non-related family of toxins, Cry and Cyt named Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa and Cyt1Aa. Interestingly the insecticidal activity of the isolated Bti toxins is magnitudes of order less toxic than the crystal inclusion containing all toxins [10,17,26]. This synergistic effect is mainly due to Cyt1Aa that enhances the activity of Cry4Aa, Cry4Ba or Cry11Aa [10,17,25]. Even more, it was

shown that Cyt1Aa overcomes resistance of *Culex quinquefasciatus* populations resistant to Cry11Aa, Cry4Aa or Cry4Ba [25].

Cry and Cyt toxins have a different three-dimensional structures and mechanisms of action. Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11Aa belong to the three-domain (3-D) family of Cry toxins that are composed of three discrete structural domains. Domain I is a seven  $\alpha$ -helix bundle that is involved in membrane insertion, oligomerization and pore-formation while domain II and domain III are  $\beta$ -sheet domains involved in receptor interaction [4,5]. In particular, the exposed loop regions in domain II are involved in receptor binding [4,5]. In contrast, Cyt proteins have a single  $\alpha$ - $\beta$  domain comprising of two outer layers of  $\alpha$ -helix hairpins wrapped around a  $\beta$ -sheet [18]. Both proteins are synthesized as protoxins that are solubilized in the gut of susceptible dipteran insects and proteolytically activated by midgut proteases leading to activated toxins. For exerting their toxic effect, 3-D Cry toxins rely on the sequential binding with at least two different midgut protein receptor molecules that in lepidopteran insects have been identified as a transmembrane cadherin and glycosyl-phosphatidil-inositol (GPI)-anchored proteins as aminopeptidase-N (APN) and alkaline phosphatase (ALP) [5,22]. Binding to cadherin facilitates further proteolytic cleavage of helix  $\alpha$ -1 and formation of an oligomer structure that gains affinity to GPI-anchored receptors leading to membrane insertion and pore-formation [5,22]. Recently, cadherin, APN and ALP molecules have been identified as Cry11Aa or Cry4Ba binding molecules in different

\* Corresponding author. Tel.: +52 777 3291618; fax: +52 777 3172388.

E-mail address: [mario@ibt.unam.mx](mailto:mario@ibt.unam.mx) (M. Soberón).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

mosquito species suggesting a conserved mode of action of Cry toxins in dipteran insects [2,8,9,12,15,27]. In contrast, activated Cyt1Aa do not rely on midgut proteins to bind to the midgut epithelium and directly interacts with membrane lipids resulting in membrane insertion and pore-formation [7].

Understanding the molecular mechanism of synergism of Cyt1Aa and Cry4 and Cry11Aa toxins could have important implications to develop strategies for resistance management of Cry toxins in agriculture and in mosquito control [6]. The mechanism of synergism of Cyt1Aa and Cry11Aa was proposed to depend on the specific interaction between these toxins since single point mutations on Cyt1Aa affected its binding interaction with Cry11Aa and their synergism [20]. Also, it was shown that loop regions of domain II from Cry11Aa toxin that are involved in receptor binding were also involved in binding and synergism with Cyt1Aa [11,20]. These data led to the hypothesis that Cyt1Aa functions as a membrane bound binding protein of Cry11Aa [20]. Furthermore, recent data showed that binding of Cry11Aa to Cyt1Aa facilitates formation of Cry11Aa oligomers that were efficient in pore-formation indicating that Cyt1Aa at least fulfils the role of the primary cadherin receptor that facilitates oligomer formation [21].

The mechanism of synergism of Cyt1Aa with Cry4Ba and Cry4Aa has not been analyzed. Although Cry4Ba and Cry11Aa share low amino acid sequence identity both bind to *A. aegypti* ALP receptor indicating that they share binding sites with at least this receptor [13]. In order to analyze if binding of Cry4Ba to Cyt1Aa was involved in their synergism, Cyt1Aa mutants that were previously shown to affect binding to Cry11Aa and in synergism were analyzed regarding to the binding of Cry4Ba and their effect on synergism against *A. aegypti* larvae was also analyzed. Even more, Cry4Ba domain II loop regions were subject to mutagenesis and Cry4Ba mutants analyzed regarding their binding and synergism with Cyt1Aa.

Here we show that some Cyt1Aa mutants affected in binding and synergism with Cry11Aa are also affected in binding and synergism with Cry4Ba. Also, that Cry4Ba domain II loop  $\alpha$ -8 is involved in its binding interaction and in synergism with Cyt1Aa. These data suggest that Cyt1Aa also functions as a specific binding protein for Cry4Ba explaining the mechanism of synergism between these two Bti toxins.

## 2. Methods

### 2.1. Growth of *B. thuringiensis*, purification of Cry4Ba and Cyt1Aa crystal inclusions and toxin activation

For the production of Cry4Ba crystals and Cyt1Aa, acrySTALLIFEROUS Bti strain Q2-81 containing plasmid pHT618 or pWF45, respectively were cultured for 3 days at 29 °C and 200 rpm in nutrient broth sporulation medium supplemented with 10  $\mu$ g erythromycin per ml. Spores and inclusions produced by the Bt strains were harvested and washed three times with 0.3 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 8.0. For Cry4Ba activation, the spores and crystals were solubilized in carbonate buffer (sodium bicarbonate/carbonate 0.1 M, pH 9.5) supplemented with 0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol [pH 10.5], and activated with 1:20 (w/w) trypsin (Sigma–Aldrich Co.), for 16 h at 37 °C. Cyt1Aa inclusions were solubilized in 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10 mM DTT, pH 10.5 and activated with 1:30 proteinase K (Sigma–Aldrich Co.) (w/w) for 1 h at 30 °C.

### 2.2. Site directed mutagenesis of Cry4Ba

Plasmid pHT618 was used as template for site directed loop  $\alpha$ -8 mutagenesis using QuikChange® Multi following the manufacturer's instructions (Stratagene). In this site directed mutagenesis system synthetic primers with the mutated sequence are annealed

to previously thermal-denatured plasmid template and amplified with PfuTurbo DNA polymerase to obtain single stranded mutated DNA. Non-mutated DNA template is digested with DpnI restriction enzyme that digest methylated DNA, prior to transformation of XL10–Gold *Escherichia coli* cells. The following oligonucleotides were used for site directed mutagenesis of cry4Ba gene:  $\alpha$ 8M1 5'CAGCTTTAGTAGAATCTCCTGCTGCTGCATCTATAGCAGCACTGGAGGC3';  $\alpha$ 8M2 5'GTAGAATCTCTTCTAGTAAAGCTGCAGCAGCACTGGAGGCAGCACTTAC3';  $\alpha$ 8M3 5'CTAGTAAATCTATAGCAGCAGCGGCGGCAGCACTTACACGAGATGTTC3'. Mutants were sequenced and transformed into acrySTALLIFEROUS Bt strain 407 as reported [11].

### 2.3. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA plates, 96-wells, were incubated 12 h at 4 °C with 250 ng/well of Cyt1Aa in 50 mM NaHCO<sub>3</sub> pH 9.6, followed by five washes with PBS, 0.2% Tween 20. The plates were then incubated with PBS, 2% BSA (Sigma–Aldrich Co.) 0.2%/Tween 20, for 1 h at 37 °C and washed five times with buffer A (PBS, 0.1% Tween 20). The ELISA plates were incubated with different concentrations of Cry4Ba or Cry4Ba mutants for 2 h at 37 °C and washed three times with buffer A. The Cry4Ba proteins bound to Cyt1Aa were detected with anti-Cry4Ba antibody (1:10,000) 2 h at 37 °C, followed by a secondary goat-anti-rabbit-antibody coupled to horseradish peroxidase (HRP) 1 h at 37 °C (1:10,000). The HRP enzymatic activity was revealed with a freshly prepared substrate 840 mg of *o*-phenylenediamine, 18 ml of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 100 ml of 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5.09. The enzymatic reaction was stopped with 6N HCl and the absorbance read at 490 nm with a Pharmacia LKB Ultraspec II.

### 2.4. Ligand blot assays

Three  $\mu$ g of Cry4Ba or Cry4Ba mutant proteins were separated in 10% SDS-PAGE and electrotransferred to Hybond-ECL membranes. After blocking with PBS-M (PBS, 5% skim milk), the membranes were incubated for 2 h with 5 nM of Cyt1Aa, and the bound protein was revealed with anti-Cyt1Aa antibody (1:70,000) 2 h at 37 °C, followed by a secondary goat-anti-rabbit-HRP antibody 1 h at 37 °C (1:10,000) and SuperSignal chemiluminescent substrate (Pierce).

### 2.5. Bioassays and synergism factors (SF)

Twenty fourth-instar *A. aegypti* larvae in 100 ml of dechlorinated water were exposed to different concentrations of Cyt1Aa and Cry4Ba toxins tested at different protein ratios (1:1, 0.5:1 and 0.2:1). Positive (Bti) and negative controls [dechlorinated water] were included in the bioassay, and larvae examined 24 h after treatment. The mean lethal concentration (LC<sub>50</sub>) was estimated by Probit analysis using statistical parameters [14] after four independent assays (Polo-PC LeOra Software). The theoretical toxicity of each ratio mixture was evaluated according to Tabashnik's equation [23], assuming a simple additive effect. The theoretical LC<sub>50</sub> value is the mean of the intrinsic LC<sub>50</sub> values of each component weighted by the ratio used in the mixture:

$$LC_{50}(\text{Cyt1Aa} + \text{Cry4BaA}) = \left( \frac{r_{\text{Cyt1Aa}}}{LC_{50}[\text{Cyt1Aa}]} + \frac{r_{\text{Cry4Ba}}}{LC_{50}[\text{Cry4Ba}]} \right)^{-1}$$

where  $r_{\text{Cyt1Aa}}$  and  $r_{\text{Cry4Ba}}$  are the Cyt1Aa and Cry4Ba protein proportions used in the final ratio of the mixture. LC<sub>50</sub> (Cyt1Aa) and LC<sub>50</sub> (Cry4Ba) are the LC<sub>50</sub> values for each individual toxin. The SF was calculated by dividing the theoretical toxicity by the observed toxicity of the mixture in bioassays. SF values greater than 1 indicate synergism.

**Table 1**  
Toxicity of Cyt1Aa, Cry4Ba and toxin mutants.

Toxin	LC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (ng/ml)
Cyt1Aa	952.5 (602.5–1824.3)
K198A	601.8 (466.3–792.7)
E204A	103.9 (80.3–134.9)
K225A	858.6 (548.5–1527.6)
Cry4Ba	79.4 (61–102)
α8M1	117.2 (93.9–146.6)
α8M2	182.2 (77.9–358.8)

<sup>a</sup> Bioassays were performed with 10 early fourth-instar *Ae. aegypti* larvae in 100 ml H<sub>2</sub>O per dose. Three independent experiments of 10 different doses each were done. Mean lethal concentration (LC<sub>50</sub>) was estimated by Probit analysis. 95% confidence limits are given in parentheses.

### 3. Results

#### 3.1. Cyt1Aa single point mutations affect Cry4Ba binding and synergism

Previously, we isolated and characterized Cyt1Aa single point mutations in loop β6–αE or in β7 that are affected in their binding interaction with Cry11Aa and their synergistic activity against *A. aegypti* insect larvae. In addition, Cyt1Aa loop β6–αE mutant K198A showed enhanced synergism with Cry11Aa [20]. Table 1 shows the mean lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of Cyt1Aa and three

Cyt1Aa mutants (K198A, E204A, K225A) that were in the range of the insecticidal activities previously reported [20]. To determine if the same Cyt1Aa amino acid regions involved in Cry11Aa binding and synergism were also involved on Cry4Ba synergism, we analyzed the synergism of Cyt1Aa mutants with Cry4Ba. Fig. 1A shows a 3D model of the Cyt1Aa structure that was obtained by comparison to that of Cyt2Ab and the location of the Cyt1Aa residues K198A, E204E and K225A. The synergism factor (SF) of different ratio mixtures of wild type Cyt1Aa and Cry4Ba toxins was determined by bioassays against *A. aegypti* fourth-instar larvae as described in Section 2. For the two wild type proteins the highest SF value of 9 was found at the 0.2:1 Cyt1Aa:Cry4Ba ratio (Table 2). At 0.2:1 mixture ratio the Cyt1Aa mutants K198A, E204A and K225A showed a reduced SF value of 3.5, 2.6 and 1.8, respectively, indicating that these mutations affected the synergistic activity between Cyt1Aa and Cry4Ba.

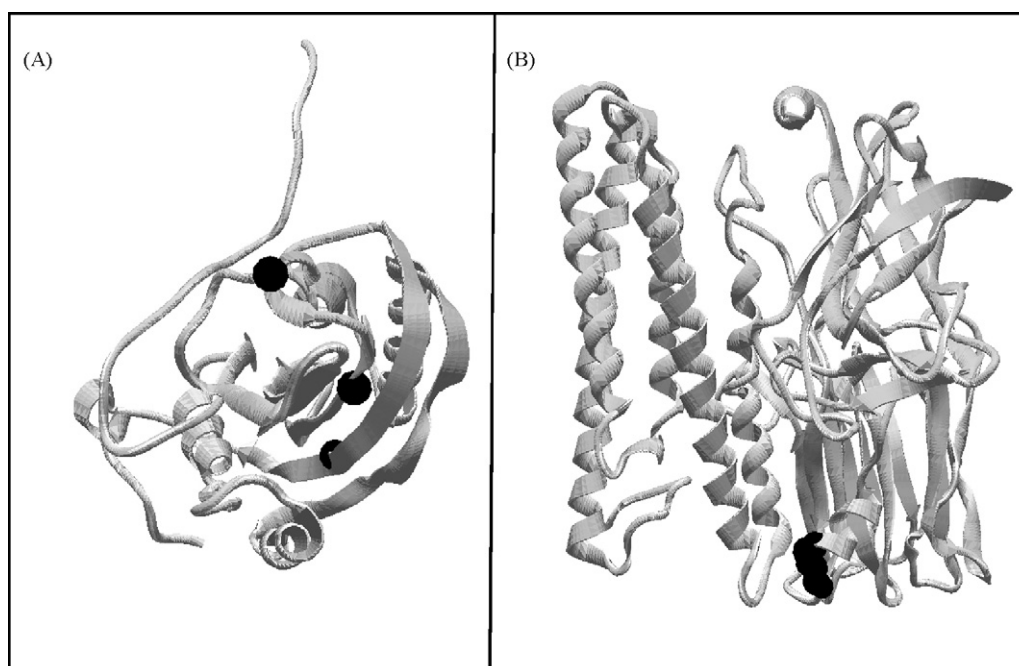
To determine if the effects of Cyt1Aa mutations on Cry4Ba synergism correlated with a decrease in their binding interaction, ELISA binding assays of Cry4Ba to Cyt1Aa mutants were performed. First, a saturation binding curve of Cyt1Aa and Cry4Ba was obtained, supporting the interaction between these two toxins and revealing an apparent binding affinity (*K<sub>d</sub>*) of 47 nM (Fig. 2A). Fig. 2B shows that Cyt1Aa mutants K198A, E204A and K225A showed a reduced binding with Cry4Ba in comparison with Cyt1Aa. These results show that synergism of Cry4Ba and Cyt1Aa correlate with their binding interaction.

**Table 2**  
Synergism factor and binding affinities of mixtures of proteins at 0.2:1 ratio.

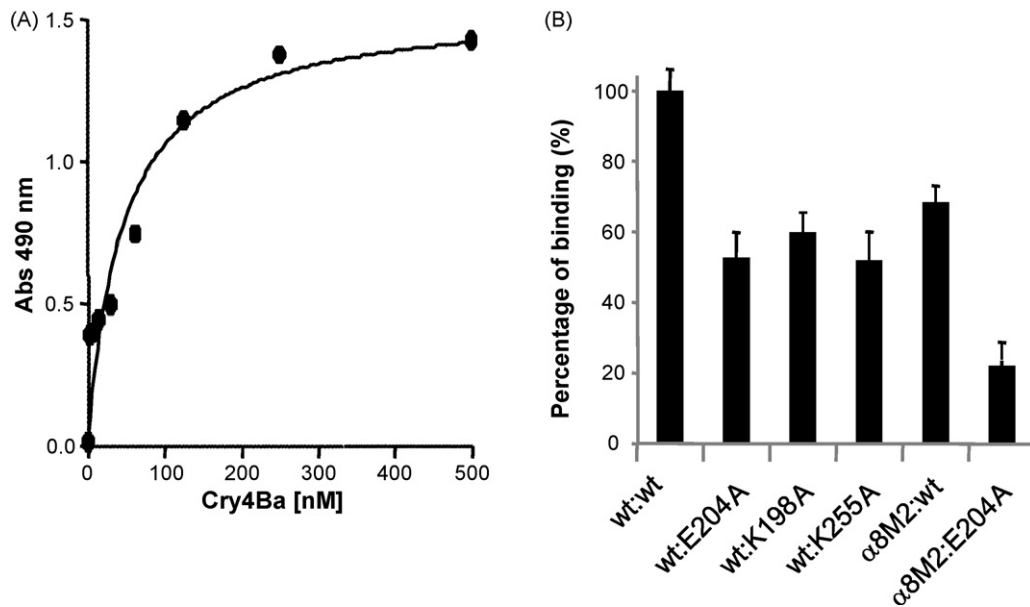
Toxins Cyt1Aa:Cry4Ba	Predicted LC <sub>50</sub> (ng/ml)	Experimental LC <sub>50</sub> (ng/ml)	SF <sup>a</sup>
wt:wt	75.2	8.5 (6.5–10.8) <sup>b</sup>	8.8
K198A:wt	74.5	21.0 (10.1–30.1)	3.5
E204A:wt	66.7	25.2 (20.1–32.3)	2.6
K225A:wt	75.1	41.4 (31.1–52.3)	1.8
wt:α8M2	218.9	38.4 (32.7–44.7)	5.7
E204:α8M2	158.3	77.2 (67.1–88.9)	2

<sup>a</sup> Synergism factor (predicted LC<sub>50</sub>/experimental LC<sub>50</sub>).

<sup>b</sup> 95% fiducial limits.



**Fig. 1.** Three-dimensional structures of insecticidal toxins produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. (A) Top view of the three-dimensional structure model of Cyt1Aa obtained by comparison to the three-dimensional structure of Cyt2Ab. Residues K198, E204 and K225 are highlighted by space filling black figures. (B) Three-dimensional structure of Cry4Ba. Domain II loop α-8 303SI304 residues are highlighted by space filling black figures.



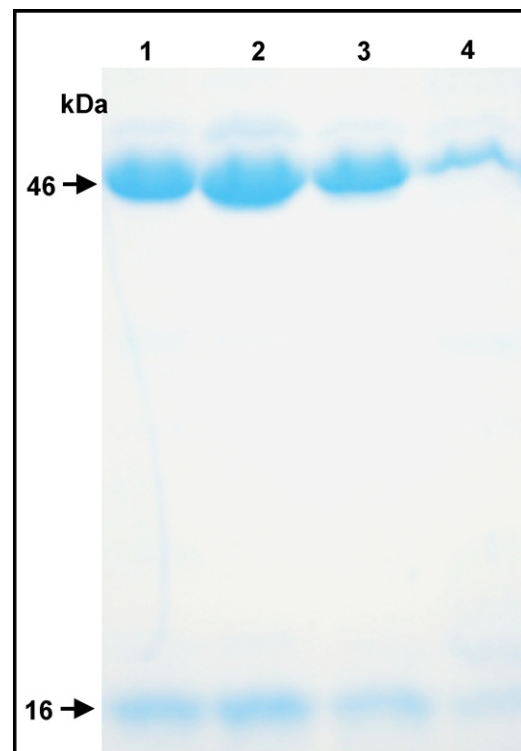
**Fig. 2.** ELISA binding assays of Cry4Ba to Cyt1Aa. (A) Saturation binding curve of Cry4Ba to Cyt1Aa. ELISA plates were coated with Cyt1Aa (250 ng/well) and revealed with different Cry4Ba concentrations followed by anti-Cry4Ba antibody and by a secondary goat-anti-rabbit-antibody coupled to horseradish peroxidase. (B) ELISA plates were coated with Cyt1Aa or Cyt1Aa mutants K198A, E204A and K225A (250 ng/well) and revealed with 75 nM of Cry4Ba or loop  $\alpha$ 8M2 mutant as described above. Data of three replicates with standard deviations.

### 3.2. Cry4Ba mutations in loop $\alpha$ -8 affect binding and synergism with Cyt1Aa

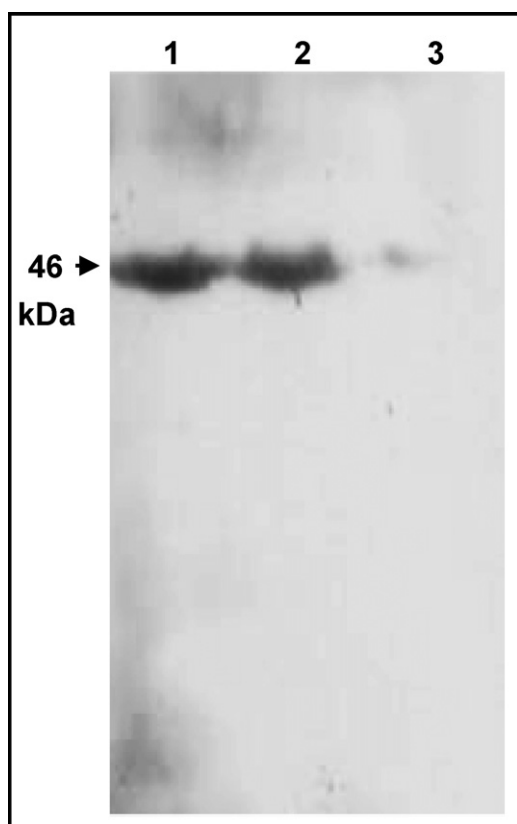
Domain II loops of Cry toxins have been recognized as important receptor binding regions in different Cry toxins [5,11,16,24]. In the case of Cry11Aa, it was shown that Domain II loop  $\alpha$ -8 was an important binding region with the ALP GPI-anchored receptor [11]. Also, this amino acid region in Cry11Aa was shown to be involved on Cyt1Aa binding and in synergism suggesting that Cyt1Aa functions as a Cry11Aa receptor [20]. To determine if Domain II loop regions of Cry4Ba are involved on Cyt1Aa binding and in synergism, we performed site directed mutagenesis of Cry4Ba Domain II loop  $\alpha$ -8 since a synthetic peptide corresponding to this amino acid region competed the binding with ALP1 protein in contrast with synthetic peptides corresponding to the other Domain II loop regions (Reyes E.Z. and Soberón M., unpublished data). Fig. 1B shows the 3D structure of Cry4Ba and the location of Domain II loop  $\alpha$ -8. Three mutants of loop  $\alpha$ -8 region (<sup>300</sup>SSKSIAALE<sup>308</sup>) were constructed, mutant  $\alpha$ 8M1 (SSK300–302AAA), mutant  $\alpha$ 8M2 (SI303–304AA) and mutant  $\alpha$ 8M3 (LE307–308AA). The three Cry4Ba mutants were transformed to the Bt 407 acrystiferous strain and cultured until sporulation. Crystals from the three mutants were solubilized and activated with trypsin. From the solubilization step it was clear that  $\alpha$ 8M3 mutant produced lower yields of the 130 kDa Cry4Ba protoxin (data not shown). Fig. 3 shows that  $\alpha$ 8M1 and  $\alpha$ 8M2 produced two bands of 48 kDa and 18 kDa as wild type Cry4Ba toxin after trypsin treatment suggesting that these two proteins have no structural constraints. In contrast,  $\alpha$ 8M3 mutations affected protein stability since it produce very low levels of the expected bands after trypsin treatment and therefore  $\alpha$ 8M3 was not further analyzed. The toxicity of Cry4Ba and loop  $\alpha$ -8 mutants was analyzed in *A. aegypti* fourth-instar larvae. Table 1 shows that  $\alpha$ 8M2 had a slight reduction in toxicity but with an overlap in the confidential limits with Cry4Ba toxicity while  $\alpha$ 8M1 showed a similar toxicity to *A. aegypti* larvae as Cry4Ba toxin.

Binding of Cry4Ba and loop  $\alpha$ -8 mutants to Cyt1Aa was analyzed by ligand blot. Cry4Ba and the two loop  $\alpha$ -8 mutants were subject to SDS-PAGE, blotted to a membrane and detected with Cyt1Aa

followed by anti-Cyt antibody. Fig. 4A shows a significant reduction in binding of  $\alpha$ 8M2 to Cyt1Aa in contrast with  $\alpha$ 8M1 that bound Cyt1Aa as wild type Cry4Ba. ELISA binding assays confirmed that  $\alpha$ 8M2 had a reduced binding to Cyt1Aa in comparison with  $\alpha$ 8M1 and Cry4Ba (Fig. 2B). Fig. 2B also shows that Cry4Ba  $\alpha$ 8M2 showed very weak binding to the mutant Cyt1Aa E204A indicating that both



**Fig. 3.** Proteolytic activation of Cry4Ba and Domain II loop  $\alpha$ -8 mutants. Different Cry4Ba proteins (5  $\mu$ g) were solubilized, treated with trypsin (1:20, w/w) and separated by 10% SDS-PAGE electrophoresis. Lane 1 Cry4Ba, lane 2  $\alpha$ 8M1, lane 3  $\alpha$ 8M2, lane 4  $\alpha$ 8M3.



**Fig. 4.** Cry4Ba Domain II loop  $\alpha$ -8 is involved on Cyt1Aa binding. Different Cry4Ba proteins (3  $\mu$ g) were activated by trypsin treatment separated by 10% SDS-PAGE electrophoresis and blotted into nylon membranes. Blots were revealed with 10 nM Cyt1Aa followed with anti-Cyt1Aa and by a secondary goat-anti-rabbit-antibody. Lane 1 Cry4Ba, lane 2  $\alpha$ 8M1 and lane 3  $\alpha$ 8M2.

Cyt1Aa and Cry4Ba mutations had an additive effect on the binding interaction of these proteins.

Bioassays were performed to determine the SF factor of Cyt1Aa and  $\alpha$ 8M2 and also of the two mutants Cyt1Aa E204A and  $\alpha$ 8M2. Table 2 shows that Cyt1Aa- $\alpha$ 8M2 showed a SF value of 5.7, while Cyt1AaE204A and  $\alpha$ 8M2 had a SF value of 2, indicating a direct correlation between Cry4Ba binding to Cyt1Aa and synergism.

#### 4. Discussion

Previous work identified specific amino acids of Cyt1Aa located in loop  $\beta$ 6- $\alpha$ E and in  $\beta$ 7 that are affected in binding to Cry11Aa and synergism. In this work we analyzed the effect of three Cyt1Aa mutants in these structural regions regarding to its binding and synergism with Cry4Ba. The three Cyt1Aa mutants analyzed, K198A, E204A and K225A showed a reduction on synergism and a correlative reduction on Cry4Ba binding indicating that the same Cyt1Aa regions are involved on Cry11Aa and Cry4Ba binding interaction. However, the Cyt1Aa K198A mutant phenotype was different regarding its effect on Cry11Aa or Cry4Ba. In the case of Cry11Aa, Cyt1Aa K198A showed an enhancement on synergism and correlated with higher binding affinity to Cry11Aa [20], while in the case of Cry4Ba, this Cyt1Aa mutation reduced the binding interaction and synergism (Fig. 1). This data shows that specific residues of Cyt1Aa binding epitope have a differential effect on its binding to different Cry toxins.

Regarding the Cry4Ba regions involved in Cyt1Aa interaction, we show that a Domain II loop  $\alpha$ -8 mutation affected Cyt1Aa binding and synergism between these toxins. As mentioned earlier Domain II exposed loops have been shown to be important for

receptor interaction in different Cry toxins [1,5,11,16,24]. In the case of Cry4Ba it has been shown that Domain II exposed loops 1, 2 and 3 are involved in binding to *A. aegypti* BBMV and in toxicity [1,16,24]. This is the first report of the mutagenesis of Cry4Ba loop  $\alpha$ -8. The mutants isolated showed a non-significant marginal effect on toxicity to *A. aegypti* larvae. However, one double alanine mutant,  $\alpha$ 8M2 [SI303-304AA], showed reduced binding to Cyt1Aa and a correlative reduction in synergism. The fact that Domain II loops are involved in both receptor and Cyt1Aa binding is a clear indication that Cyt1Aa functions as a specific binding protein of Cry4Ba mediating its toxicity.

Based on the molecular mechanism proposed for the synergistic effect of Cyt1Aa on Cry11Aa, it was proposed that Bti is the first example of an insect pathogenic bacterium that carries a toxin and also its functional receptor, promoting toxin binding to target membranes and toxicity [20]. As shown in this manuscript, this mechanism also applies for Cry4Ba. This molecular mechanism of synergism could be important to develop tools for countering insect resistance [6]. It would be interesting to identify Cyt proteins active against lepidopteran or coleopteran insects and that could synergize other Cry toxins. Alternatively, an attractive strategy to select Cyt1Aa toxins that show synergism with other Cry toxins, such as lepidopteran or coleopteran specific Cry toxins, could be the engineering of the binding regions in Cyt1Aa, thus providing additional binding sites in Cyt1Aa that could promote synergism with other Cry toxins. This would be a promising development to counteract resistant insects or to control insects with low susceptibility to the known Cry toxins.

#### Acknowledgments

We thank Lizbeth Cabrera, for technical assistance. Research was funded in part through grants from the National Institutes of Health, 1R01 AI066014, DGAPA/UNAM IN218608 and IN210208-N, CONA-CyT U48631-Q. IRdE received a José Castillejo postdoctoral grant (Spanish Ministry of Education and Science), and a grant for mobility for Teaching and Research Staff of Public University of Navarre, Spain (UPNA).

#### References

- [1] Abdullah MA, Alzate O, Mohammad M, McNall RJ, Adang MJ, Dean DH. Introduction of *Culex* toxicity into *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba by protein engineering. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:5343–53.
- [2] Abdullah MA, Valaitis AP, Dean DH. Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochem* 2006;7:16.
- [3] Becker N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: Charles JF, Delécluse A, Nielsen-LeRoux C, editors. *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Kluwer Academic Publishers; 2000. p. 383.
- [4] Boonserm P, Davis P, Ellar DJ, Li J. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J Mol Biol* 2005;348:363–82.
- [5] Bravo A, Gill SS, Soberón M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins and their potential for insect control. *Toxicol* 2007;49:423–35.
- [6] Bravo A, Soberón M. How to cope with resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol* 2008;26:573–9.
- [7] Butko P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:2415–22.
- [8] Chen J, Aimanova KG, Fernández LE, Bravo A, Soberón M, Gill SS. *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis*. *Biochem J* 2009;424:191–200.
- [9] Chen J, Aimanova KG, Pan S, Gill SS. Identification of the *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11Aa toxin. *Insect Biochem Mol Biol* 2009;39:688–96.
- [10] Crickmore N, Bone EJ, Williams JA, Ellar D. Contribution of individual components of the d-endotoxins crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis*. *FEMS Microbiol Lett* 1995;131:249–54.
- [11] Fernández LE, Pérez C, Segovia L, Rodríguez MH, Gill SS, Bravo A, et al. Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop  $\alpha$ -8 of domain II. *FEBS Lett* 2005;579:3508–14.
- [12] Fernández LE, Aimanova KG, Gill SS, Bravo A, Soberón M. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem J* 2006;394:77–84.



- [13] Fernández LE, Martínez-Anaya C, Lira E, Chen J, Evans J, Hernández-Martínez S, et al. Cloning and epitope mapping of Cry11Aa-binding sites in the Cry11Aa-receptor alkaline phosphatase from *Aedes aegypti*. *Biochemistry* 2009;48:8899–907.
- [14] Finney D. Probit analysis. United Kingdom: Cambridge University Press; 1971.
- [15] Hua G, Zhang R, Abdullah MA, Adang MJ. *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. *Biochemistry* 2008;47:5101–10.
- [16] Khaokhiew T, Angsuthanasombat Ch, Promptmas Ch. Correlative effect on the toxicity of three surface-exposed loops in the receptor-binding domain of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin. *FEMS Microbiol Lett* 2009;300:139–45.
- [17] Khasdan V, Ben-Dov E, Manasherob R, Boussiba S, Zaritsky A. Toxicity and synergism in transgenic *Escherichia coli* expressing four genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis*. *Environ Microbiol* 2001;3:798–806.
- [18] Li J, Pandelakis AK, Ellar D. Structure of the mosquitocidal d-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J Mol Biol* 1996;257:129–52.
- [19] Margalith Y, Ben-Dov E. Biological control by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis*. In: Rechcigl JE, Rechcigl NA, editors. *Insect pest management: techniques for environmental protection*. CRC Press; 2000. p. 243.
- [20] Pérez C, Fernández LE, Sun J, Folch JL, Gill SS, Soberón M, et al. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:18303–8.
- [21] Pérez C, Muñoz-Garay C, Portugal LC, Sánchez J, Gill SS, Soberón M, et al. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. *Cell Microbiol* 2007;9:2931–7.
- [22] Soberón M, Gill SS, Bravo A. Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cell Mol Life Sci* 2009;66:1337–49.
- [23] Tabasnik BE. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:3343–6.
- [24] Tuntitippawan T, Boonserm P, Katzenmeier G, Angsuthanasombat C. Targeted mutagenesis of loop residues in the receptor-binding domain of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin affects larvicidal activity. *FEMS Microbiol Lett* 2005;242:325–32.
- [25] Wirth MC, Georghiou GP, Federeci BA. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:10536–40.
- [26] Wu D, Johnson JJ, Federeci BA. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol* 1994;13:965–72.
- [27] Zhang R, Hua G, Andacht TM, Adang MJ. A106-kDa aminopeptidase is a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Biochemistry* 2008;47:11263–72.