



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

LA DOMINANCIA NEGATIVA COMO EVIDENCIA DE  
HETERO-OLIGOMERIZACIÓN ENTRE DIFERENTES  
TOXINAS Cry DE *Bacillus thuringiensis*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

DANIELA CARMONA LEÓN



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARÍA ALEJANDRA BRAVO DE LA PARRA

(2011)



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.

## Hoja de datos del Jurado

### 1. Datos del Alumno

Carmona

León

Daniela

55 52 08 42

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

304185753

### 2. Datos del tutor

Dra.

María Alejandra

Bravo

de la Parra

### 3. Datos del sinodal 1

Dr.

Mario

Soberón

Chávez

### 4. Datos del sinodal 2

Dr.

José Luis

Puente

García

### 5. Datos del sinodal 3

Dra.

Isabel

Gómez

Gómez

### 6. Datos del sinodal 4

Dr.

Luis Felipe

Jiménez

García

### 7. Datos del trabajo escrito

La dominancia negativa como evidencia de hetero-oligomerización entre diferentes toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*

65 p

2011

## DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mi mamá, mi alma gemela y mejor amiga, quien siempre ha sido y será la persona mas importante en mi vida, gracias por creer en mi, por ser el mejor ejemplo a seguir, por convertirte en ese motor que me impulsa a hacer las cosas de forma correcta; siempre te agradeceré que seas esa voz en mi cabeza, que me gusta llamar pepe grillo, te amo.

A mi papá, que con su ejemplo me ha mostrado que no existen imposibles, gracias por ser un gran ejemplo de vida.

A mis hermanos, Alejandro, Octavio y Juliana, a quien siempre he considerado una hermana, gracias por ser mis mejores amigos, por ser las personas en las que más puedo confiar sabiendo que siempre tendrán un buen consejo o un buen chiste, los admiro y los amo demasiado, siempre daré gracias por tener tan buenos hermanos, por que su gran corazón no se puede comparar con el de nadie, son todo para mi.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a la Dra. Alejandra Bravo, por confiar en mi y abrirme las puertas del laboratorio, gracias por enseñarme el significado de hacer ciencia.

Al Dr. Mario Soberón, a quien agradezco infinitamente sus comentarios y sugerencias a lo largo de este trabajo.

A la Dra. Claudia Rodríguez, por enseñarme a trabajar dentro del laboratorio.

A la Dra. Isabel, muchísimas gracias, por ser una pieza fundamental para la culminación de este trabajo.

A la Dra. Claudia Pérez por ayudarme a montar los bioensayos, y por darle color al laboratorio, te extrañamos.

A los Doctores, Helena, Liliana, Blanca y Carlos por sus sugerencias para el enriquecimiento de este proyecto.

Al Dr. José Luis Puente, por sus enseñanzas y buenos consejos.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez, por sus comentarios y observaciones.

A Leivi, por ser la mejor compañera de mesa, te agradezco todo tu apoyo y buenos consejos, pero sobre todo por ser una gran persona, que puedo considerar una gran amiga.

A Fernando, por enseñarme muchísimas cosas en el laboratorio, por toda tu ayuda, que realmente fue mucha, y por todos tus consejos, pero sobre todo por tu amistad.

A Luis Enrique, Josué, Emiliano y Abiud, por ser grandes compañeros y amigos, gracias por todos esos momentos divertidos que pasamos.

A Don Sergio, gracias por toda su ayuda, el laboratorio no funcionaría de la forma que lo hace sin usted.

A Liz, muchas gracias por todo tu apoyo con las larvas.

A Esme, por siempre ser tan buena persona y gracias por todos tus consejos.

A todos mis compañeros que forman parte del laboratorio, Biviana, Alan, Leidy Rosalba, Gladis, Jazmín, Violeta, Graciela, Jorge y Xóchitl, por darle vida al laboratorio y por formar un excelente grupo de trabajo

A mis compañeros y buenos amigos del taller Gaby, Dianita, Tati, Daniel, Sara, Fer, y Yamili, muchísimas gracias por que esta aventura no hubiera sido la misma sin ustedes.



## ÍNDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	1
ABREVIATURAS.....	3
INDICE DE FIGURAS .....	4
RESUMEN .....	5
INTRODUCCIÓN	
• Importancia de insectos en agricultura y salud.....	7
• Plagas de mosquitos vectores de enfermedades en humanos.....	8
• Control de insectos.....	10
• <i>Bacillus thuringiensis</i> en el control de insectos.....	11
• $\delta$ -endotoxinas.....	12
• Nomenclatura y clasificación. ....	12
• Mecanismo de acción de las toxinas Cry-3D.....	15
• Receptores de toxinas Cry3D en mosquitos.....	16
• Inserción de la toxina y formación del poro.....	17
• Dominancia negativa .....	20
• Toxinas Cyt .....	22
• Sinergismo.....	23
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS	
PARTICULARES.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS	
Cepas utilizadas.....	26
• Medios de cultivo.....	26
• Diseño de oligonucleótidos mutagénicos.....	29
• Fosforilación de los oligonucleótidos mutagénicos de las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba.....	29
• Reacción en cadena de la polimerasa para mutagénesis de la toxina Cry4Ba .....	30
• Digestión enzimática.....	31
• Células competentes DH10B. ....	32
• Transformación por electroporación.....	32

- Reacción en cadena de la polimerasa para mutagénesis de la toxina Cry11Aa.....32
- Ligación del producto de PCR.....33
- Transformación por choque térmico.....33
- Purificación de DNA plasmidico .....34
- Secuenciación de DNA. ....34
- Preparación y transformación de células vegetativas de *Bacillus thuringiensis*.....34
- Selección y crecimiento de colonias.....35
- Purificación de cristales de las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba mutantes y silvestres.....35
- Purificación por gradiente de sacarosa.....36
- Cuantificación de proteína método Bradford .....36
- Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida.....36
- Solubilización y activación de las toxinas.....37
- Bioensayos de curva de mortalidad de las toxinas silvestres.....38
- Bioensayos de mortalidad de las toxinas mutadas.....39
- Bioensayos de dominancia negativa.....39
- Bioensayos de sinergismo.....39

## RESULTADOS

- Construcción de mutantes afectadas en la hélice  $\alpha$ -4 del dominio I de las toxinas Cry4B y Cry11A.....39
- Producción de proteína de las mutantes construidas. ....40
- Solubilización y activación de las mutantes.....41
- Curvas de mortalidad con toxinas silvestres.....43
- Análisis de toxicidad de las toxinas mutantes Cry11Aa y Cry4Ba.....44
- Análisis de Dominancia Negativa de las mutantes E159K y V142D.....45
- Análisis de Dominancia Negativa de la mutante E97A de la toxina Cry11Aa.....46
- Ensayos de sinergismo.....47

DISCUSIÓN.....49

CONCLUSIÓN.....53

LITERATURA CITADA.....54



## ABREVIATURAS

<b>A</b>	Ampers
<b>APN</b>	Aminopectidasa tipo N
<b>ALP</b>	Alcalino fosfatasa
<b><i>B. thuringiensis</i></b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<b>BSA</b>	Albúmina sérica de bovino
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>HCT</b>	Medio de hidrolizado de triptona caseina
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonil
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b><i>subs</i></b>	Subespecie
<b>SDS-PAGE</b>	Dodecil sulfato de sodio-policrilamida de electroforesis
<b>SP</b>	Medio para la esporulación
<b>TTN</b>	Tris/ Tritón X-100/ NaCl
<b>TX-100</b>	Tritón X-100
<b>Wt</b>	Tipo silvestre.

## INDICE DE FIGURAS.

- Figura 1. Distribución de *Aedes aegypti* y áreas de transmisión de Dengue. Fuente: OMS.
- Figura 2. Infestación de *Aedes aegypti* en América durante 1930, 1970 y 2002. Modificado de la OPS 2002
- Figura 3. Microfotografía de *Bacillus thuringiensis* (Soberon y Bravo, 2008).
- Figura 4. Estructura cristalográfica de las toxinas Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa y Cry4Aa. (Pillot y Ellar, 2007).
- Figura 5. Mecanismo de acción de las toxinas Cry.
- Figura 6. Representación esquemática del modelo de interacción del dominio I de  $\delta$ -endotoxinas con membranas de fosfolípidos (Gazit et al., 1998).
- Figura 7. Representación de la dominancia negativa en la toxina del ántrax.
- Figura 8. Posición esquemática de las mutaciones realizadas.
- Figura 9. Gel SDS-PAGE 12%. Espora cristal. Carril 1 Cry4Ba silvestre, carriles, 2, 3, 4 y 5, mutantes de la toxina Cry4Ba: L125D, E159K, A145C y R158A respectivamente; carril 6 Cry11Aa silvestre, carriles 7, 8 y 9, mutantes de la toxina Cry11Aa: V142D, Q135C y N128 D respectivamente.
- Figura 10. Gel SDS-PAGE 12%. Solubilización de proteínas con Buffer de carbonatos y con NaOH 100 mM. Carril 1 Cry4Ba silvestre, carril 2 y 3 mutantes L152D y E159K respectivamente; carril 4 Cry11Aa silvestre y carril 5 mutantes V142D.
- Figura 11. Gel SDS-PAGE 12% Toxinas activadas con tripsina relación de 1:20 (proteasa: protoxina) Cry4Ba y 1:5 Cry11Aa (proteasa: protoxina).
- Figura 12. Gráfica de mortalidad. Barras negras indican el porcentaje de mortalidad de las toxinas silvestres, las barras blancas la mortalidad de la larvas utilizando una mezcla de 1:0.05 silvestres : mutante, y las barras rayadas utilizando una mezcla 1:1 silvestres:mutante.
- Figura 13. Bioensayos con larvas *Ae. aegypti*, para probar fenotipo de Dominancia Negativa de la toxina Cry11Aa E97A, a combinaciones 1:0.5, 1:1, 1:10, 1:100 toxina silvestre:mutante.
- Figura 14. Ensayos de sinergismo de la mutante Cry4Ba E159K.
- Figura 15. Ensayo de sinergismo de la toxina Cry11Aa V142.

## RESUMEN

La bacteria *Bacillus thuringiensis* durante su fase de esporulación produce un cuerpo parasporal conocido como cristal, el cual tiene propiedades insecticidas y está constituido por  $\delta$ -endotoxinas conocidas como proteínas Cry y Cyt, las cuales se han usado para el control biológico de diversas plagas de insectos ya que son específicas para su insecto blanco, son inocuas para los humanos, vertebrados y plantas, y son completamente biodegradables por lo que no contaminan el medio ambiente. Las toxinas Cry4 y Cry11 son específicas hacia mosquitos como *Aedes aegypti*.

Dentro de las toxinas Cry existe una familia de toxinas que están conformadas por tres dominios, el dominio I está formado por siete hélices alfa y se propone que este dominio está involucrado en la formación de poro lítico en las células del insecto blanco. Los dominios II y III están conformados por láminas beta plegadas y se propone que participan en la interacción con receptores presentes en el insecto blanco. Se ha descrito que en el caso de las toxinas Cry1A, que son activas hacia insectos lepidópteros, la región conformada por las hélices alfa-4 y alfa-5 es la que se inserta en la membrana para inducir la formación del poro, ya que mutantes en estas hélices afectan la toxicidad y la formación de poro. También se reportó que mutantes de la toxina Cry1Ab en hélice alfa-4 presentan un fenotipo de dominancia negativa ya que son capaces de inhibir la toxicidad de la toxina silvestre cuando se administran al mismo tiempo.

En el presente trabajo se construyeron mutantes en la hélice  $\alpha_4$  de las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba con la finalidad de determinar el papel de esta hélice del dominio I en el mecanismo de acción de estas toxinas, y su capacidad de inhibir toxicidad de toxinas silvestres.

Las mutantes E159K y V142D de las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa respectivamente presentan una pérdida en su toxicidad cuando se analizaron por medio de bioensayos hacia larvas de *Ae. aegypti*. Podemos concluir que esta mutación en la hélice  $\alpha_4$  repercute en el mecanismo de acción de estas toxinas debido a que esta hélice como ha sido reportado junto con la hélice  $\alpha_5$  son las que adquieren una posición transmembranal lo que les permite insertarse en la membrana y formar los canales iónicos. Específicamente se especula que la hélice  $\alpha_4$  se encuentra orientada hacia el lumen del poro y participa en la formación del poro, por lo que estas toxinas al

presentar una mutación puntual drástica en uno de los residuos cruciales de la hélice  $\alpha$ -4, puede que este alterando su conformación lo que les impide insertarse de forma correcta.

Se demostró el fenotipo de dominancia negativa en las mutantes construidas, ya que la mutante Cry4B-E159K inhibió la toxicidad de la toxina Cry4B y la mutante Cry11A-V142D inhibió la toxicidad de Cry11A sugiriendo que la mezcla con su respectiva toxina silvestre genera hetero-oligómeros formados por ambas toxinas que no son funcionales. En este trabajo demostramos que la toxina Cry4B pueden formar hetero-oligómeros con las toxinas Cry11A ya que la mutante Cry11Aa-V142D mostró fenotipo de dominancia negativa sobre la toxinas silvestre Cry4Ba.

Se ha reportado que la actividad de las toxinas Cry4B y Cry11A se incrementa cuando se aplican juntas en ciertos mosquitos sugiriendo un efecto sinérgico entre estas dos toxinas. Nuestros datos nos permiten proponer que el sinergismo entre las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa observado en el mosquito se debe a una interacción molecular entre ellas. Finalmente, también se ha demostrado que existe sinergismo entre las toxinas Cry4B y Cyt1Aa así como entre Cry11Aa y Cyt1Aa. En este trabajo se observó que el efecto sinérgico entre estas toxinas requiere que las toxinas Cry sean activas ya que mutantes afectadas en la hélice  $\alpha$ -4 de Cry4B o de Cry11A no son capaces de sinergizar con la toxinas Cyt1Aa.

## INTRODUCCIÓN

### Importancia de insectos en agricultura y salud.

En las últimas décadas la producción agrícola ha sido afectada por la presencia de pestes como plagas, enfermedades y malezas, lo cual afecta directamente a los cultivos.

Se define a una plaga agrícola como aquella población de seres vivos que se alimentan de las plantas, o son fitopatógenos, los cuales en un sentido económico ocasionan disminución en la producción del cultivo, el aumento en los costos de producción y la baja en el valor de la cosecha. Dentro de las plagas se encuentran: insectos, ácaros, nematodos, roedores, caracoles, aves, entre otros.

Las enfermedades son causadas principalmente por microorganismos; mientras que las malezas son aquellas plantas que compiten con las plantas cultivadas por el uso de suelo, agua y nutrimentos.

Se han caracterizado los tipos de plaga puesto que no todos los organismos fitopatógenos constituyen una plaga, y no todas las plagas ocasionan el mismo grado de daño a nivel comercial.

Los insectos son plagas importantes ya que pueden causar pérdidas en las cosechas que van del 20% hasta el 30% de las cosechas.

Con relación a las plagas de insectos se caracterizan de la siguiente manera:

- Plagas Potenciales o Fitófagos sin importancia económica: No afectan la calidad ni cantidad de las cosechas, constituyen la mayor parte de insectos en el campo agrícola, y se encuentran en poblaciones bajas que suelen pasar desapercibidas.
- Plagas Ocasionales: Poblaciones de insectos que se encuentran en grandes cantidades solamente en ciertas épocas, mientras que carecen de importancia económica en otros periodos.
- Plagas claves: especies de insectos que ocasionan daños económicos a los cultivos, puesto que se presentan de forma persistente, año tras año, en poblaciones altas.

- Plagas migrantes: Especies de insectos que como consecuencia de sus actos migratorios pueden penetrar periódicamente en campos cultivados donde no son residentes.
- Plaga directa: El insecto daña directamente a los órganos de la planta que se va a cosechar o comercializar
- Plaga indirecta: Cuando el insecto daña órganos de la planta que no se van a cosechar

Además, del efecto negativo muchas de las plagas de insectos sobre los cultivos agrícolas, también repercuten en la salud de otros organismos animales incluyendo al hombre, al servir como vector para transmitir enfermedades.

#### Plagas de mosquitos vectores de enfermedades en humanos.

La elevada densidad poblacional junto con un excesivo número de personas o animales viviendo en un mismo lugar, así como instalaciones sanitarias inadecuadas ocasionan la contaminación del medio por los desechos del hombre, basura en descomposición así como por desperdicios y excrementos de animales domésticos. Este medio contaminado favorece la propagación y proliferación de enfermedades y da lugar a la infestación por mosquitos, cucarachas, roedores, moscas domésticas, pulgas, piojos y artrópodos que son plagas vectores de enfermedades.

*Aedes aegypti* es un mosquito vector urbano con mayor importancia, ya que es capaz de transmitir el virus del dengue. También es vector de otras enfermedades como de la fiebre amarilla y de la enfermedad causada por el virus chikungunya (Gubler *et al.*, 1998; Becker *et al.*, 1993). *Aedes aegypti*, es hallado alrededor del mundo entre las latitudes 45° N y 35° S, en las zonas isotermales intermedias a los 20°C, es un mosquito que desarrolla sus criaderos únicamente en aguas limpias.

Otro potencial vector introducido a América desde el continente Asiático, es *el Aedes albopictus*, un vector considerado de menor importancia que el *Ae. aegypti* en la transmisión del virus del dengue en áreas donde ambas especies son simpátricas. Aunque menos antropofílico que el *Aedes aegypti*, posee una mayor termotolerancia a descensos de la temperatura ambiental y es considerado el vector primario en áreas en donde *Aedes aegypti* esta ausente, presentando transmisión vertical transovárica para más de 15 arbovirosis incluyendo los cuatro serotipos del Virus del Dengue.

Los mosquitos de género *Anopheles* son vectores de *Plasmodium spp*, parásitos causantes de la malaria, la cual es un problema de salud pública a nivel mundial, principalmente en África. (Greenwood *et al.*,2008). Por último en regiones tropicales y subtropicales el mosquito *Culex quinquefasciatus* es el vector de la filaríais.

El virus del dengue pertenece a la familia Flaviviridae y existen cuatro variantes, los serotipos 1, 2, 3 y 4. La inmunidad es serotipo-específica por lo que la infección con un serotipo determinado confiere inmunidad permanente contra el mismo (inmunidad homóloga), y sólo por unos meses contra el resto de los serotipos (inmunidad heteróloga).

La infección del virus de dengue es sin duda alguna la enfermedad transmitida por artrópodos más común a nivel mundial en lo que se refiere a la tasa de morbilidad (en términos de mortalidad sería la malaria) con una incidencia que aumenta en las regiones tropicales de Centro y Suramérica. Se estima que dos terceras partes de la población mundial viven en zonas infestadas con vectores del dengue, principalmente *Ae. aegypti*, en donde pueden estar circulando simultáneamente los cuatro serotipos conocidos de este virus, estimándose anualmente de 50 a 100 millones de casos por dengue clásico (DC), y de 250 000 a 500 000 casos de dengue hemorrágico (DH) en el mundo. En México en el año de 2009 se registraron, 25.029 casos de Dengue clásico y 5.907 casos de Dengue hemorrágico. La tasa de letalidad para ese año fue de 0.08%

La situación mundial respecto al virus del dengue, en las últimas décadas se ha convertido en un problema de salud importante puesto que los casos de incidencia van en aumento día con día. La enfermedad es endémica en más de 100 ciudades de África, América, el Mediterráneo y Sureste de Asia. Según estudios se estima que existen en la actualidad 50 millones de casos de Dengue en el mundo.

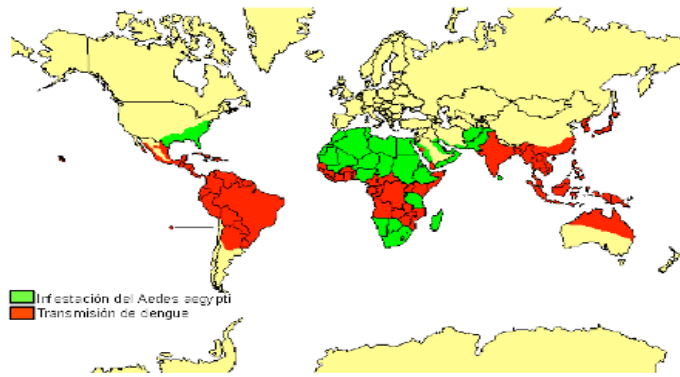


Figura 1 . Distribución de *Aedes aegypti* y áreas de transmisión de Dengue. Fuente: OMS

Los continentes Africano y Asiático han sido los más afectados con epidemias de Dengue Hemorrágico, se ha observado un incremento drástico desde 1995

En las últimas tres décadas el incremento en la presencia del Dengue en América ha sido notable, lo que se encuentra condicionado con la presencia del vector transmisor *Aedes aegypti*.

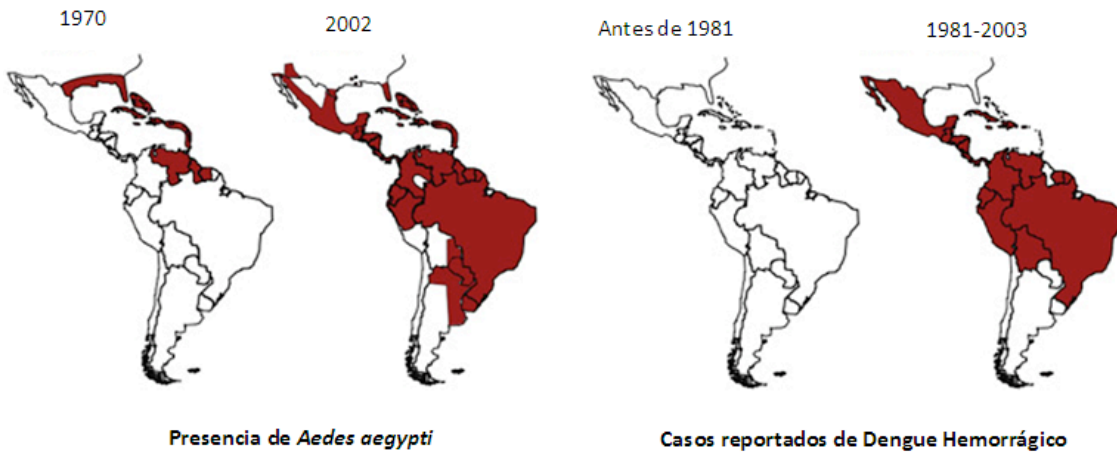


Figura 2. Distribución de *Aedes aegypti* en relación con casos reportados de DH. Adaptado de Gubler DJ 1998.

### Control de insectos

Para el control de todo tipo de plagas se han utilizado diversos compuestos químicos: pesticidas o plaguicidas, los cuales a partir de la segunda guerra mundial tuvieron su auge. Con el descubrimiento de la acción de insecticidas como el DDT y el BHC se abrió el campo para combatir insectos vectores de enfermedades, posteriormente al grupo de los insecticidas clorados



se unió el de los fosforados y el de los carbamatos y posteriormente el de los piretroides estables (Dulmage *et al.*, 1990; Karamanlidou *et al.*, 1991).

La importancia en los insecticidas radica en que sus efectos son más rápidos que el de cualquier otra forma de control, y por ser fácilmente manejables. Sin embargo, en la actualidad su eficacia ha disminuido significativamente debido al desarrollo de resistencia por parte de los insectos y han dado lugar a la aparición de nuevas plagas.

Todos los insecticidas químicos son tóxicos hacia mamíferos, además son recalcitrantes por lo que requieren tiempos muy largos para su degradación por lo que contaminan el medio ambiente y afectan poblaciones de organismos para los cuales no son blanco (Ibarra *et al.*, 1998).

La destrucción al medio ambiente así como a la fauna silvestre es radical, y los peligros de intoxicación van ligados al uso de estos controles químicos (Federici, 1995).

Por lo que es necesario la implementación de alternativas ecológicas y biodegradables para el control de ciertos tipos de plagas, que no ocasionen daños al medio ambiente, que sean específicas para su blanco y no presente toxicidad hacia otros organismos,

#### *Bacillus thuringiensis* en el control de insectos

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es una bacteria aerobia estricta, Gram-positiva, que pertenece al grupo *B. cereus*, junto con *B. anthracis* y *B. mycoide* (Helgason *et al.*, 2000). Las características entomopatogénicas de *Bt*, la distinguen del resto de los miembros del grupo. Los megaplásmidos de *Bt* llevan la información genética para la síntesis de  $\delta$ -endotoxinas y otros factores de virulencia. Estos megaplásmidos no están presentes en *B. cereus*, *B. anthracis* ni en *B. mycoide* (Höfte and Whiteley, 1989).

Durante su ciclo de vida pasa por dos fases: la vegetativa y la de esporulación. En su fase de crecimiento vegetativo, *Bt*, simplemente se duplica por medio de bipartición; durante su fase de esporulación la bacteria produce proteínas insecticidas (conocidas como  $\delta$ -endotoxinas) como inclusiones parasporales (Bechtel y Bulla *et al.*, 1976).

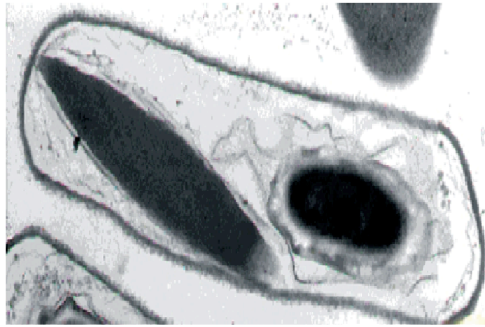


Figura 3. Microfotografía de *Bacillus thuringiensis* (Soberon y Bravo, 2008)

### δ-endotoxinas

Las δ-endotoxinas, también llamadas proteínas Cry y Cyt clasificadas en estas dos familias con base a su identidad de secuencia (Angsuthanasombat *et al.*, 1993), son inclusiones proteicas parasporales producidas por *Bacillus thuringiensis*, las cuales son tóxicas para su organismo blanco, entre los que se encuentran insectos de los géneros Díptera, Lepidóptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera, y Mallophaga, y hacia otros organismos como nematodos y protozoarios (Angsuthanasombat *et al.*, 1992; Schnepf *et al.*, 1998; De Maagd *et al.*, 2003, Bravo., *et al* 2011).

Estas toxinas son altamente específicas para su insecto blanco, son perfectas para usarlas como controles biológicos contra ciertas plagas, puesto que son inocuas para los humanos, vertebrados y plantas, y son completamente biodegradables por lo que no contaminan el medio ambiente (Shelton *et al.*, 2002).

### Nomenclatura y clasificación.

Las δ-endotoxinas forman dos familias de proteínas, Cry y Cyt. Se han encontrado proteínas Cry activas contra insectos lepidópteros, coleópteros, himenópteros y dípteros; mientras que las proteínas Cyt se encuentran esencialmente en cepas de *Bacillus thuringiensis* activas específicamente contra dípteros. La nomenclatura de las proteínas Cry y Cyt está basada en la secuencia primaria de los aminoácidos, donde los cristales proteicos reciben un mnemónico Cry o Cyt y cuatro rangos jerárquicos. Dependiendo de la identidad de secuencia compartida con otras proteínas Cry o Cyt, es asignado el rango. El primer rango es un número, el cual se asigna de manera diferente a proteínas que comparten menos del 45% de identidad con otras proteínas, el

segundo rango es una letra capital el cual se da si las proteínas comparten menos del 78% de identidad y más del 45%, el tercer rango es una letra minúscula que se asigna si las proteínas comparten menos del 95% de identidad y más del 78%. En el último rango se asigna un número si las proteínas comparten más de un 95% de identidad pero no son idénticas, y pueden ser consideradas como variantes de la misma proteína. (Crickmore *et al.*, 1998, 2002).

Las proteínas Cry se encuentran agrupadas en tres familias diferentes: Cry de tres dominios (Cry-3D), Cry binarias y Cry Mtx. La familia Cry-3D comprende de 40 subgrupos con más de 200 miembros, se define como proteína Cry a una inclusión proteica parasporal de *Bacillus thuringiensis*, con efecto tóxico hacia su organismo blanco; así como a cualquier proteína que mantenga una secuencia similar a la de una proteína Cry conocida (Crickmore *et al.*, 1998, 2002).

El grupo de toxinas Cry de tres dominios (Cry-3D) se encuentra integrado por moléculas globulares, que tienen tres diferentes dominios conectados por una sola unión. La estructura tridimensional de las toxinas Cry1Aa (Grochowski *et al.*, 1995), Cry1Ac (Derbyshire., *et al* 2001; Li., *et al* 2001), Cry2Aa (Morse., *et al* 2001), Cry3Aa (Li., *et al* 1991), Cry3Ba (Galitsky *et al.*, 2001), Cry4Aa (Bonserm *et al.*, 2006), Cry4Ba (Bonserm *et al.*, 2005), se resolvieron por cristalografía de rayos X, donde a pesar de que su porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos es muy baja, el plegamiento de estas toxinas es general, el cual se organizan en tres dominios estructurales principales (Figura 4). Al momento de hacer una alineación de la secuencia primaria se puede apreciar, en prácticamente todos los miembros de la familia Cry3-D, la presencia de cinco bloques de secuencias conservadas que representan las regiones centrales del dominio I y III de esta proteína, así como la conexión entre el dominio I y II y entre el dominio II y III (Bravo y Soberón ,2004).

Los miembros de esta familia presentan protoxinas de dos diferentes tamaños, ya sean de 130 kDa o 70 kDa. Sin embargo, al ser activadas a toxinas todas tienen un tamaño de 60 kDa en donde se localizan los tres dominios y las regiones conservadas.

Cada uno de los tres dominios de esta toxina tiene una estructura diferente así como una función:

- El dominio I está compuesto de siete  $\alpha$ -hélices donde la hélice  $\alpha$ -5 corresponde a la hélice central y se encuentra rodeada por las otras seis hélices, las cuales son anfipáticas y su lado hidrofílico ve al exterior de la molécula, mientras que la cara hidrofóbica está hacia la hélice  $\alpha$ -5 (Li., *et al* 1991). Este dominio se ha propuesto que es el encargado de la formación del canal iónico en las células blanco del intestino de insectos (Pigott y Ellar, 2007; Schnepf *et al.*, 1998).
- El dominio II está conformado por tres láminas beta-plegadas que se encuentran alrededor de un centro hidrofóbico en forma de prisma (Li *et al.*, 1991), este dominio representa la parte más divergente de la estructura; está implicado en la selectividad ya que presenta regiones importantes para la interacción con los receptores: caderina, aminopeptidasa-N y alcalinofosfatasa (Fernández *et al.*, 2005; Pacheco *et al.*, 2009).
- El dominio III, esta conformado por dos láminas beta-plegadas antiparalelas, en forma de sándwich (Grochulski *et al.*, 1995), también está implicado en la selectividad del insecto porque tiene regiones importantes para la unión a los receptores aminopeptidasa y fosfatasa alcalina (Caramori *et al.*, 1999; Bravo *et al.*, 1992; de Maagd *et al.*, 1996; Arenas *et al.*, 2010).

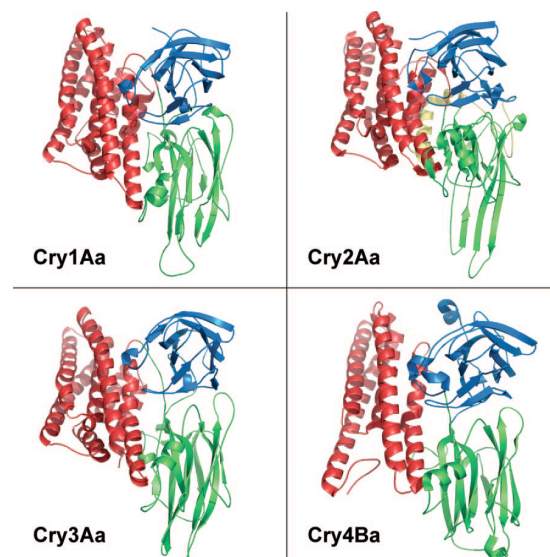


Figura 4. Estructura cristalográfica de las toxinas Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa y Cry4Aa. (Pilot y Ellar, 2007)

## Mecanismo de acción de las toxinas Cry-3D

La acción de las toxinas Cry-3D es lisar las células epiteliales del intestino de sus insectos blanco, formando poros líticos. Se ha descrito el mecanismo de acción para toxinas Cry activas contra lepidópteros, como modelo se utilizó la toxina Cry1Ab (Gómez., *et al* 2002; Bravo., *et al* 2004; Pacheco., *et al* 2009). Este es un proceso complicado, compuesto de una serie de pasos, que se listan a continuación:

1. Las inclusiones cristalinas son ingeridas por las larvas de insectos
2. Estas inclusiones se disuelven en el ambiente alcalino y reductor, a un pH de 9- 10, del intestino del insecto y la protoxina solubilizada inactiva es activada por proteasas presentes en el intestino de la larva hasta llegar a la forma activa de la toxina con un tamaño de 60 kDa (Choma *et al.*, 1990; Falcon *et al.*, 1971).
3. El monómero se une a sus primeros receptores anclados por un puente glicosil-fosfatidil inositol (GPI) como son aminopeptidasa-N y fosfatasa alcalina, en una interacción de baja afinidad. Estos dos receptores se encuentran muy abundantes en la microvellosidad apical (Pacheco *et al.*, 2009).
4. Posteriormente la toxina se une al siguiente receptor, una proteína de tipo caderina por la cual tiene mayor afinidad pero se encuentra en menor abundancia. Esta unión provoca un cambio conformacional en la toxina, que induce la remoción proteolítica de su extremo amino terminal, incluyendo la hélice  $\alpha$ -1 del dominio I . Se propone que este corte proteolítico expone regiones hidrofóbicas lo cual facilita la oligomerización de la toxina formando una estructura de 250 kDa.
5. Una vez que oligomeriza la toxina, esta expone sitios de contacto para unirse a los receptores aminopeptidasa N (APN) o fosfatasa alcalina (ALP), que se encuentran ancladas a la membrana por GPI por lo que se localizan en regiones estructurales de la membrana llamadas balsas lipídicas
6. La función de estos receptores es facilitar la inserción del oligómero de la toxina en la bicapa, formando el canal iónico por el que fluyen iones y agua, lo que conduce a la muerte de las células del intestino y de la larva (Knowles *et al.*, 1994; Whalon *et al.*, 2003).

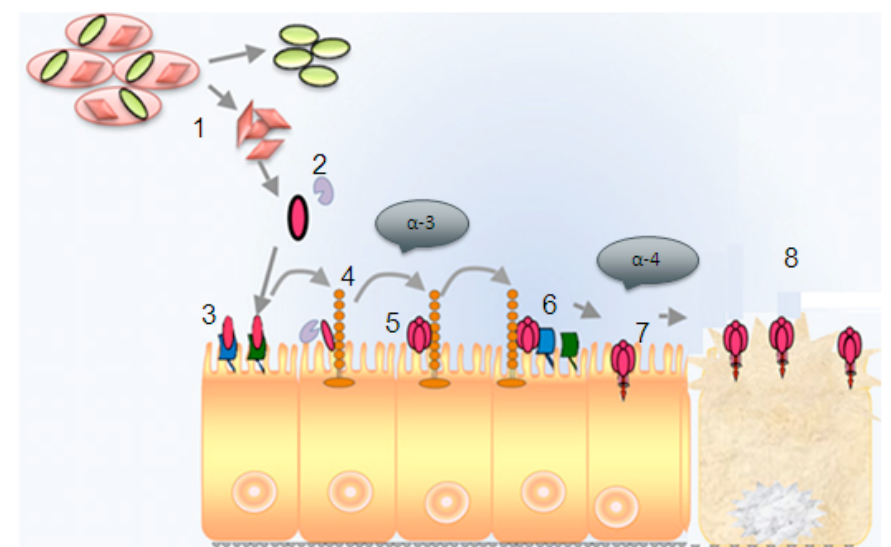


Figura 5. Mecanismo de acción: (1) solubilización del cristal, (2) activación proteolítica de la toxina, (3) unión del monómero a receptores anclados a GPI de baja afinidad, (4) unión a receptores de alta afinidad y corte de la hélice alfa 1, (5) formación de oligómero, (6) unión a receptores anclados por GPI, (7) inserción en la membrana celular y (8) lisis celular (Pacheco, S. 2010 Tesis doctoral)

### Receptores de toxinas Cry3D en mosquitos

En el caso de mosquitos además de las proteínas caderina, APN y ALP se ha identificado una  $\alpha$ -amilasa anclada también por GPI, como receptor de la toxina Cry4B de uno de los vectores de la malaria, *An. albimanus* (Fernández *et al.*, 2010). La expresión de receptores se ha correlacionado con la susceptibilidad a la acción de las toxinas.

En larvas *Ae. aegypti* la distribución de caderina se ha observado en las microvellosidades de la caeca y en las células del epitelio del intestino posterior, pero no se ha observado en la membrana apical del intestino anterior (Chen *et al.*, 2009).

La caderina que se une a las toxinas Cry tiene 4 dominios estructurales: Citoplásmico, transmembranal, dominio extracelular membrana proximal y el ectodominio. El ectodominio en mosquitos consiste de 11 repeticiones de caderina (CR).

En *Ae. aegypti* en el dominio de unión a toxina Cry11Aa se mapeo en el fragmento C-terminal que contenía los repetidos de CR7 a CR11, teniendo afinidad con Cry11Aa de  $\sim 17$ nM con este fragmento a través del loop  $\alpha 8$  y loop 2 del dominio II de la toxina (Chen *et al.*, 2009).

La distribución del receptor ALP tiene una correlación con la distribución de la caderina, así como con la unión de la toxina Cry11Aa, encontrándose predominantemente en las células epiteliales del intestino posterior y en la caeca de larvas de mosquitos (Chen *et al.*, 2009).

Las proteínas APNs han sido identificadas como receptores de toxinas Cry en muchas especies de insectos. En mosquitos se han caracterizado receptores APN para toxinas Cry; en *An. quadrimacalatus* y *An. gambiae* se han caracterizado identificados receptores APN para la toxina Cry11Ba (Zhang *et al.*, 2008; Abdullah *et al.*, 2006).

Por medio de ensayos ha sido posible aislar e identificar receptores APN en *Ae. aegypti*, AaeAPN1 y AaeAPN2, los cuales se unen a la toxina Cry11Aa (Chen *et al.*, 2009).

#### Inserción de la toxina y formación del poro.

La inserción en la membrana de las toxinas Cry en las células epiteliales del intestino se lleva a cabo después de la unión a sus receptores, esta inserción requiere de cambios conformacionales de la toxina para así exponer su lado hidrofóbico en su superficie e interactuar con la membrana (de Maagd.,*et al* 2001; Iacovache., *et al* 2008).

El dominio de esta toxina que ha sido reconocido como el formador del poro, es el dominio I, puesto que presenta similitud con el dominio formador de poro de otras toxinas bacterianas como la colicina 1<sup>a</sup>, los dominios de translocación de la toxina de difteria, y hemolisina (Aronson y Shai, 2001). La función de este dominio en la inserción en la membrana y la formación de canales iónicos ha sido apoyada por diversos estudios de mutagénesis (Wu y Aronson, 1992), y análisis de fluorescencia de diversos residuos marcados con diferentes colorantes fluorescentes mostraron que los dominios I y II de la toxina permanecen en la superficie de la membrana y que solo una porción del dominio I es el que se inserta en la bicapa lipídica, apoyando así el modelo de sombrilla (Zavala., *et al* 2011).

El análisis del dominio I de las toxinas Cry ha demostrado que este dominio está formado por hélices  $\alpha$ , donde 6 de ellas rodean al hélice  $\alpha$ -5, y que las hélices exteriores son anfipáticas; donde los residuos polares o cargados se encuentran generalmente expuestos al solvente y los residuos hidrofóbicos se proyectan hacia el centro de la hélice  $\alpha$ 5 (Li *et al.*, 1991). Este dominio es importante en el mecanismo de acción de la toxina específicamente en la inserción en la

membrana y formación del poro, donde se ha reportado que las hélices  $\alpha$ -4 y  $\alpha$ -5 pueden tener una orientación preferentemente transmembranal, se ha reportado en toxinas activas contra lepidópteros Cry1Ac que el loop que conecta a la hélice  $\alpha$ -4 y hélice  $\alpha$ -5 es necesario para que estas dos hélices transmembranales se inserten de forma adecuada en lípidos de bicapas y se lleve a cabo la formación de poros líticos (Gerber y Shai, 2000); mientras que las hélices  $\alpha$ -2,  $\alpha$ -3,  $\alpha$ -7 tienen mayor afinidad hacia la superficie de la membrana.

Por otro lado, estudios realizados con péptidos sintéticos han demostrado que las hélices  $\alpha$ 4 y  $\alpha$ 5 son las únicas capaces de adoptar una orientación transmembranal (Aronson y Shai, 2001; Gazit *et al.*, 1998). Lo cual sugiere que estas son las hélices que se insertan en la membrana y que el resto permanece en la superficie (Figura 6.). Esto concuerda con el modelo de sombrilla el cual sugiere que las hélices  $\alpha$ 4 y  $\alpha$ 5 forman una horquilla para iniciar la inserción en la membrana, después de la penetración de esta horquilla, las hélices restantes se extienden en la superficie de la membrana (Schwartz., *et al* 1997).

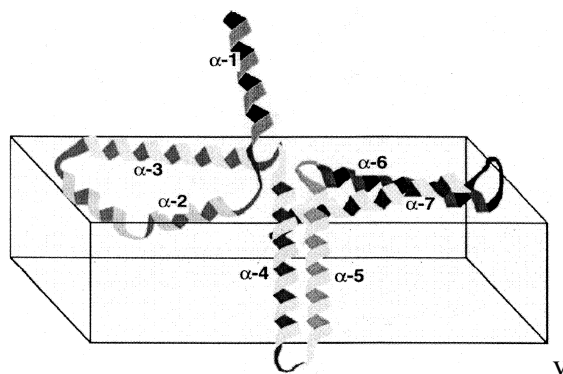


Figura 6. Representación esquemática del modelo de interacción del dominio I de  $\delta$ -endotoxinas con membranas de fosfolípidos (Gazit *et al.*, 1998).

Por último, los diversos estudios en donde se reportan mutantes sitio dirigidas han permitido concluir que la hélice  $\alpha$ -3 del dominio I tiene un papel muy importante para la oligomerización. Mutantes en la hélice  $\alpha$ -3 de las toxinas Cry1Ab y Cry11Aa son incapaces de oligomerizar y pierden por completo la toxicidad hacia insectos blanco (Jiménez *et al.*, 2007, Muñoz-Garay *et al.*, 2009).

Por otro lado, se ha demostrado que la hélice  $\alpha$ -4 es importante para la formación del poro durante el mecanismo de acción de las toxinas Cry y por lo tanto para su toxicidad, puesto que



estudios *in vitro* sugieren que la hélice  $\alpha$ -4 se encuentra orientada hacia el lumen del poro y participa en la formación del canal iónico (Masson *et al.*, 1999; Sramala *et al.*, 2001) y que la hélice hidrofóbica  $\alpha$ -5 interactúa con los lípidos de membrana (Nunez-Valdez *et al.* 2001).

Se reportó que la hélice  $\alpha$ -4 interviene en la formación del poro, mediante una colección de mutantes donde se reemplazó de cada uno de los residuos de la hélice  $\alpha$ -4 del dominio I de la toxina Cry1A por cisteínas, las cuales fueron analizadas por medio de bioensayos y por experimentos de Light-scattering de vesículas de membrana de *Manduca sexta*, demostrando que las mutantes afectadas en su toxicidad también se encuentran afectadas en su habilidad para formar poro y que las mutantes en la cara polar de la  $\alpha$  hélice 4 son las involucradas en la formación de poro (Girard *et al.*, 2008).

En relación con toxinas activas contra mosquitos, el grupo del Dr. Angsuthanasombat realizó mutaciones en los residuos cargados y en uno polar de la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry4B y demostró por medio de bioensayos que la sustitución por alanina del residuo Arg 158 es crítica para su toxicidad. Sin embargo, no hacen análisis de la formación de poro de esta mutante (Sramala *et al.*, 2001)

También se han reportado mutaciones en la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry11A en residuos polares o cargados, Lys-123, Tyr-125, Asn-128, Ser130, Gln-135, Arg-136, Gln139 y Glu-141, se expresaron en *E. coli* y se analizó la toxicidad contra *Aedes aegypti* de cada mutante, la toxicidad fue completamente inhibida en las mutantes que se realizaron en el residuo Arg-136, aunque fuera cambiado por un residuo conservado, lo que reveló que este residuo juega un papel importante para la función de la toxina en el lado cargado de la hélice (Angsuthanasombat *et al.*, 2001).

Las mutaciones con efectos más significativos en la toxicidad hacia mosquitos *A. aegypti* se encuentran del lado polar de la hélice  $\alpha$ -4, por lo cual se especula que esta cara de la hélice es importante para la formación del poro. Sin embargo la formación de poro no fue analizada (Angsuthanasombat *et al.*, 2001).

Por otro lado, se reportó que la sustitución por alanina de residuos polares en Asn 183, de la hélice hidrofóbica  $\alpha$ -5 de la toxina Cry4B, expresada en *E. coli* pierde por completo toxicidad hacia larvas *Stegomyia aegypti*, en comparación con otras mutantes Tyr128, Gln180, Asn185,

Asn195, las cuales solo muestran una pequeña disminución en su toxicidad (Likitvivatanavong *et al.*, 2006).

Finalmente, sustituciones por alanina de varios residuos aromáticos de la hélice  $\alpha 7$  de la toxina Cry4Ba, Trp243, Tyr249 y Phe264 han dado como resultado la pérdida de la toxicidad de la toxina. Las dobles mutantes Y249L/F264L ó F264A/Y249A también tienen pérdida total de la toxicidad, se especula que en la toxina Cry4Ba la hélice  $\alpha$ -7, según el modelo de sombrilla, pudiese funcionar como un sensor de unión a membrana sin embargo sus elementos funcionales no se han identificado (Tiewisiri *t al.*, 2007).

### Dominancia negativa.

El efecto de dominancia negativa se ha observado en diversas toxinas formadoras de poro en células de mamífero como en la toxina del Anthrax la cual está compuesta de una subunidad B llamada antígeno protector (PA), y por dos subunidades alternativas: Factor edema (EF) y factor letal (LF). La combinación de PA y EF es la toxina edema ETx, la cual causa edema cuando se inyecta de forma subcutánea en animales de laboratorio, y la combinación de PA y LF es la toxina Letal LTx y esta puede causar la muerte si se inyecta de forma intravenosa.

Estas proteínas son secretadas de forma independiente y se ensamblan en forma de complejos en la superficie de células de mamíferos, PA se une a un receptor celular y esta unión produce que su extremo amino-terminal, un fragmento de 20 kDa, sea cortado por proteasas de membrana. El fragmento que sigue unido al receptor de membrana es el carboxilo terminal de 63 kDa, el corte proteolítico induce la oligomerización del fragmento de 63 kDa en un heptámero. El heptámero es capaz de unirse a EF o LF, el complejo de toxinas ensambladas es endocitado y se dirige hacia los endosomas, el bajo pH presente en los endosomas induce un cambio conformacional en el heptámero, permitiendo la inserción en la membrana de una región discreta que finalmente formará un barril de láminas  $\beta$  para formar un poro.

El resultado final es la formación de un canal por el cual se translocan a las subunidades de EF y/o LF a través de la membrana del endosoma, se demostró que mutantes de la toxina PA localizadas en la región que se inserta en la membrana pierde por completo la toxicidad, porque no forman poro y son capaces de inhibir la toxicidad de la toxina silvestre, ya que pueden formar hetero-oligómeros entre toxinas mutantes y silvestres, resultando en oligómeros no funcionales.

Ratones los cuales han sido expuestos a LTx purificada, fueron protegidos contra sus efectos al inyectarles mutantes de PA afectadas en residuos del lumen del poro. Estas moléculas mutadas de PA son capaces de unirse a la célula, oligomerizar y unirse a LF; sin embargo no pueden formar canales ni translocar LFn, las mutantes PA pueden co-oligomerizar con PA silvestre, inhibir por completo su acción y exhibir el fenotipo de dominancia negativa, donde heteroheptámeros son inactivos y no pueden translocar a EF o LF a través de las membranas (Mourez *et al.*, 2002) Figura 7.

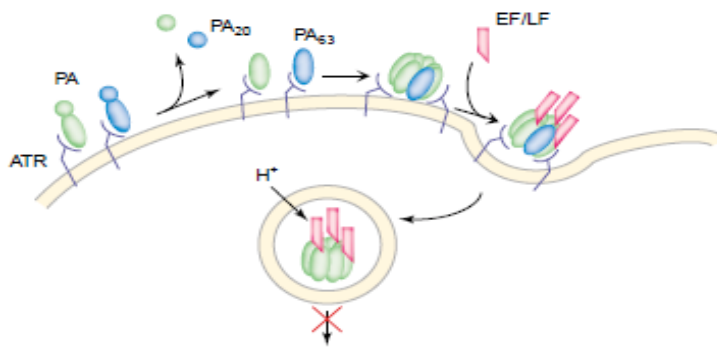


Figura 7. Representación de la dominancia negativa en la toxina del ántrax, donde PA mutada (azul), la cual es capaz de co-oligomerizar con la PA silvestre (verde) y formar heteroheptámeros los cuales no pueden translocar EF o LF (Mourez *et al.*, 2002).

De manera similar las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* pueden presentar un fenotipo de dominancia negativa cuando se utilizan mutantes en la región que forma poro.

Estudios recientes muestran que mutantes de toxina Cry1Ab (activa contra insectos lepidópteros) localizadas en la cara polar de la hélice  $\alpha$ -4 (E129K, T142C, T143D) pierden por completo su toxicidad, ya que son incapaces de formar poro en la membrana del insecto blanco, pero si son capaces de formar estructuras oligoméricas. (Rodríguez-Almazan *et al.*, 2009).

### Toxinas Cyt.

La familia de las toxinas Cyt por otro lado se conforma por dos subgrupos Cyt1 y Cyt2 (Crickmore *et al.*; 1998, 2002), estas toxinas también son sintetizadas como protoxinas (Cheong y Gill, 2003) y una pequeña porción tanto de su extremo amino terminal como de su carboxilo terminal es removida para activar la toxina (Armstrong *et al.*, 1985; Li *et al.*, 1996). Estas

proteínas son tóxicas solo para insectos del género Díptera (Soberón *et al.*, 2007), y siempre vienen acompañadas por toxinas Cry de 3D activas para dípteros. Lo más importante de las toxinas Cyt es que son capaces de sinergizar los efectos de las toxinas Cry y potenciar su acción insecticida contra mosquitos (Wu *et al.*, 1994; Bravo *et al.*, 2007).

Como se mencionó arriba, las toxinas Cyt tienen actividad específica contra insectos dípteros *in vivo*, pero es importante resaltar que *in vitro* tienen actividad citolítica en un gran número de células, como en los eritrocitos (Knowles, 1994).

El modo de acción de las toxinas Cyt comienza con la solubilización de la protoxina en condiciones reductoras y pH alcalino del intestino del insecto; posteriormente un procesamiento proteolítico de la protoxina, resulta en la activación de la toxina Cyt. La unión de la toxina a la superficie de las células epiteliales del intestino y la formación del poro da lugar a la lisis celular y la muerte de la larva; sin embargo, a diferencia de las toxinas Cry, la unión de las toxinas Cyt no se lleva a cabo mediante receptores, se propone que se unen a fosfolípidos de la membrana celular. Se han propuesto dos mecanismos mediante los cuales las toxinas Cyt se insertan en la membrana uno de los cuales es, que oligómeros de toxinas Cyt forman un barril de hojas  $\beta$  que penetra en la membrana, donde la región transmembranal consiste de hojas  $\beta$  del extremo N-terminal de la toxina (Promdonkoy *et al.*, 2003); el segundo mecanismo de acción consiste en que las toxinas Cyt ejercen su acción a través de una forma de acción de tipo detergente la cual es menos específica y requiere concentraciones mayores de toxina (Thomas *et al.*, 1983; Manceva *et al.*, 2005).

#### Sinergismo entre toxinas de *Bti*

*Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* es uno de los insecticidas biológicos más efectivo, usado en el control de mosquitos, puesto que esta bacteria produce al menos 4 diferentes  $\delta$ -endotoxinas Cry4A, Cry4B, Cry11A y Cyt1A; la más abundante es la toxina Cyt1A ya que el 40% del total de proteínas cristal producidas por *Bt israelensis* corresponde a proteínas Cyt (Promdonkoy *et al.*, 2005). La toxina Cry4B muestra gran toxicidad contra larvas de *Aedes* y *Anopheles*; sin embargo, permanece inactiva contra larvas de *Culex* (Promdonkoy *et al.*, 2005). Otra cepa de Bt que produce otras toxinas activas contra mosquitos como la toxina Cyt2Aa2 es *Bt*

*darmstadiensis* que exhibe actividad moderada hacia larvas de *Aedes* y *Culex* (Promdonkoy *et al.*, 2005).

Las toxinas Cry y Cyt se sinergizan cuando actúan juntas, los cristales nativos purificados de *Bt israelensis* muestran alta toxicidad hacia larvas de mosquitos, mientras que la actividad larvicida disminuye de manera considerable cuando se analiza la toxicidad de cada toxina purificada de forma individual (Promdonkoy *et al.*, 2005).

El sinergismo se debe a la interacción entre las toxinas Cry y Cyt, como se mencionó anteriormente, las toxinas Cyt son endotoxinas hidrofóbicas que no comparten homología con las toxinas Cry, se ha demostrado que una mezcla de toxinas Cyt1A y Cry11A con una proporción de 0.2:1 (Cyt1A: Cry11A), la toxicidad aumenta hasta 18 veces (Pérez *et al.*, 2005). También se mostró que al mezclar Cry11A con Cyt1A se suprime casi por completo la tasa de resistencia hacia toxinas Cry11A en larvas seleccionadas como resistentes a las toxinas Cry11Aa (Wirth *et al.*; 1997), por lo que se propuso que las toxinas Cyt funcionan como receptores de las toxinas Cry11Aa y posteriormente se determinó que estas dos toxinas tienen una afinidad de 0.4 nM, además las toxinas Cyt pueden inducir la oligomerización de Cry11Aa cuando interactúan, lo que comprueba que pudiera ser un receptor que *Bti* seleccionó (Pérez *et al.*, 2005, Pérez *et al.*, 2007 )

La toxina Cyt2A2 también es capaz de sinergizar a toxinas Cry activas contra mosquitos, la coexpresión de Cry4Ba y Cyt2Aa2 en *E. coli* incrementa significativamente la toxicidad contra *Culex* y *Aedes*, en comparación con la actividad tóxica de las toxinas por separado (Promdonkoy *et al.*, 2005), con estos ensayos se advirtió el sinergismo por primera vez de una toxina que no mostraba toxicidad hacia el insecto y que Cry4Ba, una vez combinada con la toxina Cyt2A se observaba sinergismo resultando en el aumento de la toxicidad (Promdonkoy *et al.*; 2005).

Recientemente se analizó el efecto tóxico de la toxina Cyt1Aa en el vector *Anopheles albimanus* donde se mostró que esta toxina por sí sola no presenta toxicidad contra este organismo incluso exponiéndolo a concentraciones de 1000 ng/ml de toxina, en contraste con el vector *Aedes aegypti* donde sí presenta toxicidad; sin embargo, al mezclar a las toxinas Cyt1Aa y Cry11Aa así como a Cyt1Aa y Cry4Ba se observó un efecto sinérgico aumentando la toxicidad hacia larvas *An. albimanus* (Fernandez-Luna *et al.*, 2010).

Respecto al posible sinergismo entre diferentes toxinas Cry de *Bti*, por medio de bioensayos con larvas del vector de la malaria, *An. albimanus*, se ha demostrado la existencia de sinergismo entre las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba, ya que al mezclarlas se observa que la toxicidad de estas aumenta significativamente (Fernández-Luna *et al.*, 2010).

En otro reporte, se presentan los resultados de los bioensayos realizados con cristales purificados de la cepa 4Q2-81 que contiene el plásmido pHT652, el cual codifica para ambas toxinas, tanto para Cry4A como para Cry4B, mostraron que existe mayor toxicidad hacia las 3 especies de mosquitos *Ae. aegypti*, *An. stephensi* y *C. pipiens*, que cuando se encuentran por separado estas toxinas. Esta alta toxicidad aparentemente es el resultado del sinergismo entre estas toxinas y no simplemente un efecto aditivo (Delécluse *et al.*, 1993).

Finalmente, bioensayos realizados con larvas de mosquitos de *Ae. aegypti*, mostraron que existe sinergismo moderado pero significativo entre las toxinas Cry4A y Cry11A, así como entre las toxinas Cry4B y Cry11A contra mosquitos (Crickmore *et al.*, 1995), se mostró que no se requiere la co-cristalización de Cry4A y Cry4B para que se lleve a cabo el sinergismo entre estas toxinas (Poncet *et al.*, 1995).

## HIPÓTESIS

La hélice  $\alpha$ -4 del dominio I de las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba, al igual que en la toxina Cry1A, es importante en el mecanismo de acción, participando en la formación de poro y toxicidad de las toxinas, por lo que mutantes puntuales en esta región podrían generar toxinas que formen hetero-oligómeros con fenotipo de dominancia negativa e inhiban la toxicidad de las toxinas silvestres.

El dominio I de las toxinas Cry es semejante, y este dominio es el involucrado en la oligomerización así como en la formación de poro de estas toxinas, por lo cual es posible que diferentes toxinas Cry interactúen entre ellas y oligomericen en hetero-oligómeros.

Para que pueda existir sinergismo entre las toxinas Cry y Cyt, es necesario que las toxinas Cry se encuentren activas en la formación de poro y por lo tanto sean tóxicas.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de la hélice  $\alpha$ -4 del dominio I de las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba en el mecanismo de acción de estas toxinas y su capacidad de inhibir toxicidad de toxinas silvestres.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar mutaciones en la hélice  $\alpha$ -4 del dominio I de los toxinas Cry4Ba y Cry11Aa.
- Analizar estabilidad de las mutantes durante la solubilización y la proteólisis.
- Realizar bioensayos en larvas de cuarto instar de *Ae. aegypti*.
- Determinar el fenotipo de dominancia negativa de las mutantes con su respectiva toxina silvestre.
- Determinar si una mutante en la hélice  $\alpha$ -4 de la toxina Cry11Aa es capaz de inhibir a la toxina Cry4Ba silvestre.
- Determinar si existe sinergismo entre las mutantes construidas y la toxina silvestre Cyt1Aa.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### Cepas utilizadas

- *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* / 4Q2-81 pHT611 que contiene el gen de la proteína Cry4Ba y resistencia eritromicina (Delécluse *et al.*, 1993).
- *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*/ CG6 que contiene el gen la proteína Cry11Aa y resistencia a eritromicina (Chang *et al.*, 1993).
- *Bacillus thuringiensis* 407 acristalifera (Agaisse y Lereclus, 1995).
- *Escherichia coli* XL-Gold

- *Escherichia coli* DH10B

### Medios de cultivo

Medio SP: Volumen final 500 ml.

Tabla 1. Medio SP

Medio SP	500 ml
Caldo nutritivo	4 g
Bacto-agar	7.5 g
KCl	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.125 g

Solución	Compuesto	Agregar al medio
1	MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O (10 mM)	500 µl
2	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	800 µl
3	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (5 mM)	400 µl

Mezclar el caldo nutritivo, el bacto-agar, el cloruro de potasio, el sulfato de magnesio y la solución 1 en 497 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7 y esterilizar en autoclave. Cuando el medio se enfrié, agregar el antibiótico junto con las soluciones 2 y 3. Antes de gelificar se vierte en cajas Petri.

Medio HCT 500 ml

Tabla 2. Medio HCT

Medio HCT	500 ml
Bacto-triptona	2.5 g
Casaminoácidos	1.0 g
Bacto-agar	7.5 g



Disolver los componentes bactotripton, casamino-ácidos y bacto agar en 467 ml de agua destilada y ajustar el pH a 7.2 con KOH y esterilizar. Dejar enfriar y agregar el antibiótico y las soluciones previamente esterilizadas (las soluciones se aforan a 100 ml con agua):

Tabla 3. Soluciones para medio HCT

Solución	Compuesto	Pesar y disolver en 100 ml de agua destilada	Agregar al medio
Solución1	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	6.8 g	25 ml
Solución2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.23 g 0.0169 g 0.14 g	0.5 ml
Solución 3	$\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{H}_2\text{SO}_4$ (stock 1N)	0.2 g 10 ml	5 ml
Solución 4	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.47 g	5 ml
Glucosa 10%	Dextrosa	10 g	10 ml

Agregar al medio 25 ml de la solución 1, 0.5 ml de la solución 2, 5 ml de la solución 3 y 4, y 15 ml de glucosa al 10 %. Vertir en cajas Petri antes de gelificar.

#### Medio LB 1L

Tabla 4. Medio LB

Peptona	10g
Extracto de levadura	5 g
NaCL	10 g

Aforar a 1L y esterilizar, si es medio sólido agregar 15 g de agar antes de esterilizar

Medio SOB 1L

Tabla 5. Medio SOB

Bactotripton	5g
Extracto de levadura	1.25 g
NaCl	0.125 g
KCl 0.25 M	2.5 ml

Ajustar a pH 7

Medio SOC 10.2 ml

Tabla 6. Medio SOC

Medio SOB	10 ml
Glucosa 2 M	0.100 ml
MgCl <sub>2</sub> 1M	0.100 ml

Medio BHI (Infusión cerebro-corazón)

Bacto-BHI dihidratado 37 g. Aforar a 1L de agua y esterilizar en autoclave durante 20 min.

## 1.- DISEÑOS DE OLIGONUCLEOTIDOS MUTAGÉNICOS

Se diseñaron oligos mutagénicos para la construcción de mutantes en la hélice  $\alpha$ -4 del dominio I de las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de mutantes en las toxinas Cry11Aa y Cry4B

Mutante	Oligonucleótidos
Cry4Ba	
A145C	5' AAC CAG TCC TAT AGA ACA TGC GTA ATA ACT CAA TTT AAC TTA ACC 3'
L152D	5' GTA ATA ACT CAA TTT ACC GAC ACC AGT GCC AAA CTT CGA GAG ACC 3'
E159K	5' AGT GCC AAA CTT AGA AAG ACC GCA GTT TAT TTT AGC 3'
R158A	5' ACC AGT GCC AAA CTT GCA GAG ACC GCA GTT TAT TTT AGC 3'
Cry11Aa	
R136A	5' AGT GGT GCT ATA ATA CAA GCA TTA CTT CAA TTT GAG 3'
Q135C	5' AAT CTA AGT GGT GCT ATA ATA TGC CGA TTA CCT CAA TTT GAG 3'
N128D	5' GCC AAG GGT TAT TTT CTA GAC CTA AGT GGT GCT ATA ATA CAA CG 3'
V142D	5' CGA TTA CCA CAA TTT GAG GAC CAA ACA TAT GAA GG 3'

## 2.- FOSFORILACIÓN DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS MUTAGÉNICOS DE LAS TOXINAS Cry11A y Cry4B.

Se requiere la fosforilación de los oligonucleótidos (SIGMA-ALDRICH) para realizar la ligación enzimática de ácidos nucleicos puesto que es requerido para la ligasa un grupo fosfato en la posición 5'.

Los oligos mutagénicos cuantificados son fosforilados siguiendo la siguiente tabla:

Tabla 8. Fosforilación de oligonucleótidos

OLIGO	Buffer 10X	Enzima PNK	Oligo (3 pmol)	ATP (0.1mM)	DTT (100mM)	H2O
Cry4B						
A145C	5 $\mu$ l	1 $\mu$ l	2.7 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	39.3 $\mu$ l
L152D	5 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1.49 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	45.5 $\mu$ l
E159K	5 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1.4 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	40.6 $\mu$ l
R158A	5 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1.14 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	39.9 $\mu$ l
Cry11A						
N128D	5 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1.14 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	40.9 $\mu$ l
Q135C	5 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	40.5 $\mu$ l
V142D	5 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	41.5 $\mu$ l

Para que se lleve a cabo la fosforilación se deben incubar a 37°C durante 30 minutos sin agitación y posteriormente detener la reacción a 65°C por 20 minutos. Almacenarlos a -20°C

### 3.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA MUTAGÉNESIS DE LA TOXINA Cry4Ba

Para la construcción de las mutantes, en la hélice  $\alpha$ -4 del dominio I de la toxina Cry4Ba: A145C, L152D, E159K y R158A se utilizó el kit de PCR mutagénico QuickChange Multi site-directed mutagenesis. Utilizando como DNA templado el vector pHT611 el cual codifica para la toxina Cry4Ba (Delécluse et al; 1993).

Para cada una de las mutantes se siguió la siguiente tabla para poner el PCR:

Tabla 9. Reacción de PCR

10x quick change multi reaction buffer	2.5 $\mu$ l
Quick solution	0.75 $\mu$ l
DNA templado (100ng)	1 $\mu$ l
Primer mutagénico (100ng)	2 $\mu$ l
dNTP's	1 $\mu$ l
Quick change multi enzyme blend	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	16.7 $\mu$ l

Tabla 10. Ciclos de PCR mutagénico

No. Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	5 minutos
35	94°C	1 minuto
	55°C	1 minuto
	65°C	15 minutos
1	65°C	10 minutos

#### 4.- DIGESTIÓN ENZIMÁTICA

La digestión enzimática del producto de PCR se realiza con la enzima DpnI la cual reconoce y digiere exclusivamente el DNA que se encuentra metilado, con lo que el DNA molde se digirá y no el plásmido mutado que proviene de la reacción de PCR el cual no se encuentra metilado.

A cada una de la reacciones de PCR se les agrega 1  $\mu$ l de la enzima de restricción DpnI, se mezcla de forma gentil pipeteando la solución (sin agitar), e incubar la reacción por 1 hr a 37°C. Posteriormente la reacción es purificada usando el kit QIAGEN para productos de PCR según las especificaciones del fabricante.

## 5.- CELULAS COMPETENTES DH10B.

Se preparan células competentes DH10B para transformación por electroporación. De una colonia aislada se inicia un precultivo de LB líquido, el cual se incuba toda la noche a 37°C con agitación de 250 rpm. Inocular 4 ml del precultivo en un matraz conteniendo 250 ml de LB líquido e incubar a 37°C con agitación hasta que las células alcancen una densidad óptica entre 0.4 a 0.6 (aproximadamente en 4 hrs) medida a una longitud de onda 600 nm. Una vez alcanzada la densidad óptica se colocan las células en hielo por 30 minutos; centrifugar a 4000 rpm en centrifuga refrigerada (4°C) durante 10 minutos, decantar el sobrenadante y resuspender el pellet. Lavar con glicerol al 10% estéril y centrifugar a 4000 rpm, decantar completamente el sobrenadante y agregar 4 ml de glicerol al 10%, resuspender y hacer alícuotas de 65  $\mu$ l. Todo el procedimiento se hace en estéril y evitando que las células se calienten. Congelar las alícuotas en hielo seco y almacenarlas a -70°C.

## 6.- TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACIÓN

Se colocan las células DH10B en hielo junto con las celdas para electroporar de 0.1 cm, se agrega el producto de PCR, digerido y purificado, a la alícuota de células competentes; estas se pasan a las celdas para electroporar y se da un pulso eléctrico de 1.3 mV, 200 ohms y 25  $\mu$ faraday; añadir 1 ml de LB líquido e incubar a 37°C por 1 hora con agitación a 650 rpm; centrifugar 1 min a 1,000 rpm, decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 100  $\mu$ l de LB líquido y platear en cajas de LB ampicilina 100 $\mu$ g/ml e incubar toda la noche a 25°C.

## 7.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA MUTAGÉNESIS DE LA TOXINA Cry11Aa.

Para la construcción de las mutantes N128D, Q135C y V142D de la toxina Cry11Aa, se utilizó el kit Phusion Site-Directed Mutagenesis, el DNA templado fue el vector pCG6 que contiene el gen de la toxina Cry11Aa (Chang et al; 1993); la reacción de mutagénesis se realizó de acuerdo a la siguiente tabla para cada una de las mutantes.

Tabla 11. Componentes para la reacción de mutagénesis de la toxina Cry11A

Componente	Volumen
H <sub>2</sub> O	33.5 $\mu$ l
5x phusion HF buffer	10 $\mu$ l
10mM dNTPs	1 $\mu$ l
Oligo mutagénico	4 $\mu$ l
Templado de DNA	1 $\mu$ l
Phusion hot start DNA polymerase (2U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l

Tabla 12. Ciclos de PCR mutagénico

No. de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	98°C	30 s
25	98°C	5-10s
	65-72°C	10-30s
	72°C	
1	72°C	15-30s
	4°C	Hold

#### 8.- LIGACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

Se realiza una ligación del producto de PCR, a 5  $\mu$ l del producto de PCR (25ng) se le agrega 5  $\mu$ l del buffer de ligación 2x Quick ligation buffer y 5  $\mu$ l de la ligasa QuickT4 DNAligase y se mezcla. Se da un pulso en la centrifuga y se incuba a 25°C durante 5 minutos, y se almacena a -20°C.

#### 9.- TRANSFORMACIÓN POR CHOQUE TÉRMICO

Para transformar por medio de choque térmico, 45  $\mu$ l de la células competentes XL10-gold se le adiciona 2  $\mu$ l de  $\beta$ -mercapto-etanol, agitar brevemente e incubar las células en hielo por 10 minutos, agitando cada 2 minutos. Transferir 1.5  $\mu$ l de la reacción de mutagénesis (después de

haber sido ligada) y agitar suavemente, incubar la reacción en hielo durante 30 minutos y dar un shock de calor por 30 segundos a 42°C, incubar los tubos en hielo por 2 minutos.

Adicionar 0.5 ml de medio SOC a cada reacción e incubar los tubos a 37°C por 1 hr a 650 rpm, platear 200 µl de cajas de LB ampicilina 200 µg/ml e incubar a 37°C por 12 hrs.

#### 10.- PURIFICACIÓN DE DNA PLASMIDICO

Seleccionar colonias de las mutantes de ambas toxinas, hacer parches en cajas de LB ampicilina 100 µg/ml y poner cultivos líquidos de 10 ml de LB ampicilina 100 µg/ml de cada uno de los parches e incubar a 25°C durante 12 hrs; extraer DNA de los cultivos líquidos con el kit comercial *Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system* de promega de acuerdo a las instrucciones del fabricante, el cual está basado en el método de lisis alcalina y absorción del DNA en una resina, con el cual a partir de 5 ml de cultivo se obtiene de 15 a 20 µg de DNA suficientemente puro para ser utilizado en reacciones de secuenciación.

#### 11.- SECUENCIACIÓN DE DNA.

La secuenciación se realizó en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología-UNAM

#### 12. PREPARACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS VEGETATIVAS DE *Bacillus thuringiensis*.

La preparación de células competentes de *Bt407* consiste en estriar una caja de LB sólido (agar) sin antibiótico con la cepa de *Bt 407* acristalifera e incubarla durante 12hrs a 30°C, tomar una muestra y extenderla sobre una caja de LB sólido sin antibiótico e incubar a 30°C durante 3 hrs; recuperar las células en 500 µl de medio BHI y homogenizar completamente con una pipeta, inocularlo en 100 ml de medio BHI a 30°C hasta obtener una densidad óptica de 0.6 a 600 nm; centrifugar el cultivo a 5000 rpm durante 5 minutos y resuspender en 50 ml de buffer EB frío, centrifugar las células y resuspender en 1.5 ml de EB y mantenerlas en hielo hasta su utilización.

Para la transformación 10 µl del DNA purificado de los cultivos de mutantes de *E. coli*, se agregan a la alícuota de 300 µl de células, incubar en hielo durante 5 minutos, se transfieren a celdas de electroporación de 0.4 cm previamente enfriadas y se les dió un choque de 2.5V, 1000



$\Omega$  y 25 $\mu$ faraday; posteriormente son incubadas en hielo durante 5 minutos, y se le añaden 700  $\mu$ l de medio BHI, son recuperadas en tubos eppendorf y se incuban durante 1 hr a 30°C. Por último se platean 250  $\mu$ l en cajas de LB eritromicina 25  $\mu$ g/ml para la toxina Cry11Aa y 10  $\mu$ g/ml para la toxina Cry4Ba, y se dejan incubar 12 horas a 30°C para el crecimiento de colonias.

### 13.- SELECCIÓN Y CRECIMIENTO DE COLONIAS

Se seleccionan las colonias que crecieron después de la incubación y se estrían en cajas de LB eritromicina 25  $\mu$ g/ml para Cry11Aa y 10  $\mu$ g/ml para Cry4Ba posteriormente se incuban a 30°C. En los 3 días consecutivos se hace un pase de las cepas a cultivo nuevo y la incubación se realiza a 30°C por 24hrs.

### 14.- PURIFICACIÓN DE CRISTALES DE LAS TOXINAS Cry11Aa Y Cry4Ba MUTANTES Y SILVESTRES.

Para la obtención y purificación de los cristales de las proteínas Cry11Aa y Cry4Ba con sus respectivas mutantes, se utilizaron los medios de esporulación HCT y SP, respectivamente, adicionando 10  $\mu$ g/ml de eritromicina para las toxinas Cry4Ba y 25  $\mu$ g/ml de eritromicina para las toxinas Cry11Aa.

Se prepara el medio líquido (200 ml para cada cepa) y una vez esterilizado se adicionan los stocks correspondientes y glucosa al 10%, se recupera 1/8 de caja de cada una de las cepas (tanto de Cry11Aa silvestre y mutantes como de Cry4Ba silvestre y mutantes), crecer a 30°C hasta esporulación completa con agitación de 250 rpm; para comprobar que la esporulación esta completa se revisa en el microscopio la presencia de cristales y esporas, posteriormente se recupera el cultivo y se centrifuga a 10,000 rpm, se resuspende y se lava la pastilla en 30 ml de 0.3 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 8 y centrifugar a 10,000 rpm ,10 min. Los lavados se repiten 3 veces y se elimina el sobrenadante, posteriormente se resuspende y lava la pastilla en 30 ml de H<sub>2</sub>O con PMSF 1 mM, este lavado se repite 2 veces y se elimina el sobrenadante, la pastilla se resuspende en 6 ml del buffer TTN (20 mM tris, 300 mM NaCl, Tritón X-100 al 0.1%, pH 7.2) por cada matraz en esporulación, la muestra se sonica dando 2 pulsos de 50 segundos a 20 watts.

## 15.- PURIFICACIÓN POR GRADIENTE DE SACAROSA

Se preparan gradientes discontinuos de sacarosa al 84%, 79%, 72% y 67%, se funden y dejan enfriar. Posteriormente se añaden 400  $\mu$ l de tritón al 0.1%, 2 ml Tris-HCl 1M pH 8 y 80  $\mu$ l de NaCl 5 M. Se agrega 6 ml de la concentración de 84% en el fondo del tubo y a continuación se colocan en orden las siguientes soluciones de sacarosa, por último se carga en cada gradiente 2 ml de la muestra sonicada y centrifugar a 23,000 rpm durante 20 minutos, a 15°C, en la ultracentrífuga. Separar las fracciones y observar al microscopio, generalmente las fracciones que contienen los cristales son la 1 y la 2, la sacarosa se elimina lavando con 30 ml de H<sub>2</sub>O más tritón al 0.01%, centrifugar a 10,000 rpm, se elimina el sobrenadante y la muestra se lava mínimo tres veces, la pastilla se resuspende en Tris 50 mM pH 8, PMSF 1 mM.

## 16.- CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA METODO BRADFORD

Para el análisis de la proteína total se utilizó el método de Bradford, utilizando una curva estándar de albumina sérica bovina (BSA) en un rango de concentración 1-20 mg. Para calcular la concentración de una muestra, se toma 1  $\mu$ l y este se lleva a un volumen de 800  $\mu$ l, posteriormente se agrega 200 $\mu$ l del reactivo Bradford 5X (Bio-Rad), se toma la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 595nm en un espectrofotómetro (Beckman), y los valores se calculan por medio de regresión lineal respecto a una curva estándar que se hace con albúmina bovina .

## 17.- ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis en condiciones desnaturalizantes se realiza utilizando un amortiguador de corrida Tris-Glicina-SDS a un voltaje de 20 mA. Las muestras se preparan utilizando mezcla lítica 4X, posteriormente se hierven durante 5 minutos, y se centrifugan 1 min para cargarlas en el gel.

Tabla 13. Componentes de un gel de acrilamida

Gel de acrilamida al 12% (5m)	
H <sub>2</sub> O mili-Q	1.7 ml

Tris-HCl 1M pH 8.8	2 ml
Acrilamida / Bis-acrilami 30%	1.3 ml
SDS 10%	0.05 ml
APS 10%	0.05 ml
TEMED	0.002 ml
Gel concentrador 2 ml	
H <sub>2</sub> O mili-Q	1.4 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 6.8	0.25 ml
Acrilamida / Bis-acrilami 30%	0.33 ml
SDS 10%	0.02 ml
APS 10%	0.02 ml
TEMED	0.002 ml

## 18.- SOLUBILIZACIÓN Y ACTIVACIÓN DE LAS TOXINAS.

Solubilización de la toxina Cry4Ba.

Se preparan las siguientes soluciones:

a) 100 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (carbonato de sodio) 0.5 M

b) 100 ml de NaHCO<sub>3</sub> (bicarbonato sodico) 0.5 M

La solución de bicarbonatos se ajusta a pH= 10.2:

Tomar 50 ml de la solución (b) y ajustar pH con la solución (a), añadir volúmenes de 1 ml, como a los 4 ml agregar poco a poco, cuando deje de subir ajustar con NaOH. Aforar hasta 100 ml, la solución final queda a una concentración de 5X y se debe usar 1X.

Incubar dos horas a temperatura ambiente los cristales con la solución de bicarbonatos, antes de incubar los cristales se deben centrifugar a 11,000 rpm, 4°C, 10 min, 50 µl de la espora cristal,

desechar sobrenadante y resuspender el precipitado con 100 µl del buffer de bicarbonatos pH 10.2 con β-mercapto-etanol: tomar del stock (buffer) 200 µl y añadir 800 µl de agua para que quede 1X, a este mililitro añadir β-mercapto-etanol 0.02%, mezclar, y tomar para resuspender el pellet, por último se debe incubar dos horas a temperatura ambiente sin agitación, centrifugar 10,000 rpm a 4°C durante 10 min, y recuperar el sobrenadante (desechar el pellet) y cuantificar la proteína del sobrenadante por Bradford

#### Activación de la toxina Cry4Ba

Tomar una alícuota de protoxina (100 µl), adicionar 25 µl Tris/HCl 1 M, pH 8, adicionar tripsina 1:20 p/p (1 µg tripsina/ 20 µg protoxina). Incubar cuatro hrs a 37°C con agitación, detener reacción con PMSF 1 mM (final). Centrifugar a 10,000 rpm, 4°C, 10 min y recuperar sobrenadante, analizar en gel 15% SDS-PAGE.

#### Solubilización y activación de la toxina Cry11Aa

Centrifugar los cristales a 11,000 rpm, 10 min a 4°C, desechar el sobrenadante y resuspender el precipitado en una solución 100 mM NaOH a 4°C por una hora en agitación, centrifugar a 11,000 rpm por 10min a 4°C y recuperar sobrenadante, cuantificar concentración de proteína por Bradford y ajustar el pH a 10.5 con HCl 5M.

Activar con tripsina (SIGMA) en una proporción proteasa: protoxina 1:5 a 25°C durante 2 hrs en agitación. Detener la reacción con PMSF 1 mM (final) analizar en gel 15% SDS-PAGE.

### 19.- BIOENSAYOS DE CURVA DE MORTALIDAD DE LAS TOXINAS SILVESTRES.

Los cristales purificados por gradiente de sacarosa de las toxinas silvestres son cuantificados por el método de Bradford. Estos cristales serán utilizados para alimentar a larvas de *Aedes aegypti* de cuarto instar. En vasos de 100 ml con 10 larvas cada uno se agregan los cristales purificados y cuantificados, en 10 concentraciones distintas (5 ng/ml- 1000 ng/ml) para cada toxina y se realiza por triplicado; 24 hrs después se cuentan las larvas muertas, y los datos se analizan con el programa probit POLO PLUS y así se obtiene la LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub> de cada una de las toxinas silvestres.

## 20.- BIOENSAYOS DE MORTALIDAD DE LAS TOXINAS MUTADAS

Larvas de cuarto instar de *Aedes aegypti*, en vasos de 100 ml de agua con 10 larvas cada uno, son expuestas a concentraciones muy altas (5000 ng/ml) de cada una de las toxinas mutantes (L152D, E159K, V142D), 24 hrs después se cuantifica la mortalidad de cada una de las toxinas.

## 21. BIOENSAYOS DE DOMINANCIA NEGATIVA

Se cuantifica la cantidad de proteína tanto de las mutantes que no presentan toxicidad como de las silvestres, utilizando la concentración  $LC_{50}$  de las silvestres se realizaran combinaciones 1:1 y 0.5:1 mutante:silvestre, cada combinación antes de ser puesta en contacto con las larvas será sonicada durante 10 segundos a 20 watts. Las larvas de cuarto instar de *Aedes aegypti* estarán en contacto con las toxinas (mutante:silvestre) durante 24 hrs en vasos con 100 ml de agua y 10 organismos vivos.

## 22. BIOENSAYOS DE SINERGISMO

Los bioensayos de sinergismo se realizaron en vasos con 20 ml de agua y 10 larvas de mosquitos *Ae. aegypti*, las cuales son alimentadas con la combinación de la  $LC_{10}$  de la toxina Cyt1Aa y la  $LC_{10}$  de las toxinas silvestres (Cry11Aa y Cry4Ba), de igual forma se alimentaron utilizando las toxinas mutantes en combinación con la toxina Cyt1Aa, después de 24 hrs se cuantifica la mortalidad de las larvas.

## RESULTADOS

### Construcción de mutantes en la hélice $\alpha$ -4 del dominio I de las toxinas Cry4B y Cry11A

Con la finalidad de analizar el papel de la hélice  $\alpha$ -4 del dominio I de las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa, se propuso realizar mutaciones puntuales en la cara polar de esta región en ambas toxinas, puesto que se ha descrito que en las toxinas Cry1A la cara polar de esta hélice se encuentra orientada hacia el lumen del poro.

De este manera podremos analizar si estos cambios en las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa afectan su funcionalidad.

La construcción de las mutantes se realizó basándonos en el criterio usado en las mutantes previamente reportadas, las cuales están afectadas en la formación de poro en las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab, donde el cambio de aminoácidos se hacía por uno de carga neutra u opuesta. Las mutantes E159K, L152D, A145C, y R158A en la hélice  $\alpha$ -4 del dominio I de la toxina Cry4Ba, se llevaron a cabo con el kit de PCR mutagénico QuickChange Multi site-directed mutagenesis, se utilizó como templado el plásmido pHT611; mientras que las mutantes de la toxina Cry11Aa; Q135C, N128D y V142D se construyeron con el kit Phusion Site-Directed Mutagenesis, usando como templado el plásmido pCG6. Se utilizó un kit de mutagénesis diferente dado que en un inicio no se obtuvieron mutantes de la toxina Cry11Aa cuando se trabajó con el kit Quick Change y por eso se tomó la decisión de probar con otro kit que teníamos disponible en el laboratorio.

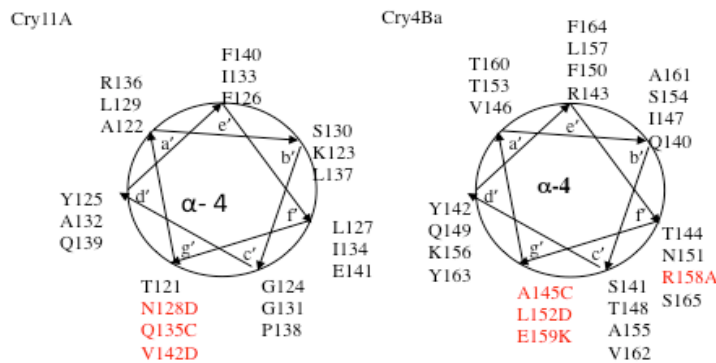


Figura 8. Representación esquemática de las mutaciones realizadas.

### Producción de proteína de las mutantes construidas.

Se analizó la producción de proteína de todas las mutantes durante la esporulación en medio HCT y las proteínas de los cristales se observó en un gel SDS-PAGE al 12%. Este análisis mostró que solo algunas de las mutantes, dos de la toxina Cry4Ba (L125D y E159K) y una de la toxina Cry11Aa (V142D), producen proteínas del mismo peso molecular que las toxinas silvestres, 70 kDa para el caso de Cry11Aa y 130 kDa para Cry4Ba. Las otras mutantes no producen proteínas Cry, lo que sugiere que el cambio mutagénico tiene un efecto importante en la estabilidad estructural de la proteína, por lo cual esas mutantes no pueden ser analizadas (Fig. 9).

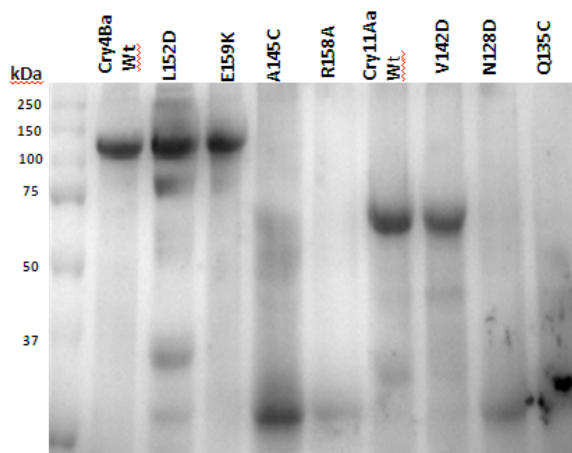


Figura 9. Gel SDS-PAGE 12%. Espora cristal. Carril 1 Cry4Ba silvestre, carriles, 2, 3 , 4 y 5, mutantes de la toxina Cry4Ba: L125D, E159K, A145C y R158A respectivamente; carril 6 Cry11Aa silvestre, carriles 7, 8 y 9, mutantes de la toxina Cry11A: V142D, Q135C y N128 D respectivamente.

### Solubilización y activación de las mutantes.

Se continuó la caracterización de las mutantes que sí producían cristales proteicos con un peso correcto. Primero fueron analizadas para ver la estabilidad de la proteína por medio de solubilización de los cristales, puesto que dentro del mecanismo de acción de estas toxinas se lleva a cabo una solubilización dentro del ambiente alcalino de los insectos, es importante comprobar que las nuevas construcciones puedan realizar este proceso. Estos estudios demostraron que estas mutantes son estables ante el proceso de solubilización. En la Fig 10 se muestra un gel SDS-PAGE al 12% de las toxinas mutadas y su comparación con toxinas Cry11Aa y Cry4Ba silvestres.

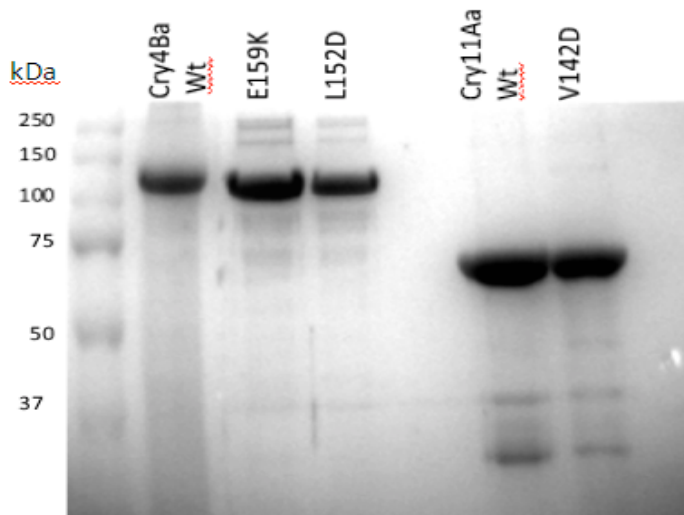


Figura 10. Gel SDS-PAGE 12%. Solubilización de proteínas con Buffer de carbonatos y con NaOH 100 mM. Carril 1 Cry4Ba silvestre, carril 2 y 3 mutantes L152D y E159K respectivamente; carril 4 Cry11Aa silvestre y carril 5 mutantes V142D.

Posteriormente se sometieron a una digestión enzimática para comprobar su correcta activación, por lo que fueron tratadas con tripsina tanto las toxinas silvestres como las mutantes. Se ha reportado que la protoxina Cry4Ba de 130 kDa, al ser activada con tripsina genera dos fragmentos que son resistentes al corte con esta serin-proteasa: uno de 48 kDa y el otro de 16 kDa, los cuales se mantienen asociados y son capaces de retener su toxicidad (Angsuthanasombat et al., 1993; Komano et al., 1998); por otro lado la toxina Cry11Aa a su vez también genera dos fragmentos que son resistentes a tripsina de 36 kDa y de 32 kDa estos fragmentos permanecen asociados; sin embargo, en un gel desnaturizante se pueden distinguir perfectamente (Dai *et al.*, 1993). En la Fig. 11 se muestran las toxinas mutantes tratadas con tripsina y su respectiva toxina silvestre, donde se observa que las toxinas mutantes tienen un procesamiento correcto igual que el de las toxinas silvestres.



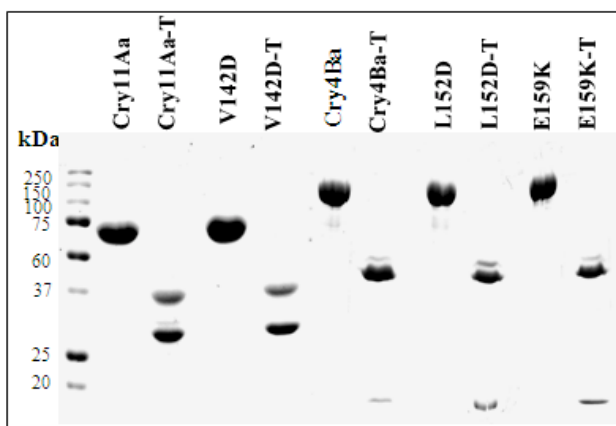


Figura 11. Gel SDS-PAGE 12% Toxinas activadas con tripsina relación de 1:20 (proteasa: protoxina) Cry4Ba y 1:5 Cry11Aa (proteasa: protoxina).

### Curvas de mortalidad con toxinas silvestres.

Se obtuvo una curva de mortalidad utilizando larvas de cuarto instar de *Ae. aegypti* expuestas con cristales de las cepas silvestres de las toxinas Cry11Aa, Cry4Ba y Cyt1Aa purificadas por gradientes de sacarosa, donde el rango de concentración de muestra de cristales purificados que se utilizó fue de 5-1000 ng/ml.

Tabla 13. LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub> de las toxinas Cry11Aa, Cry4Ba y Cyt1Aa

TOXINA	LC <sub>10</sub> (ng/ml)	LC <sub>50</sub> (ng/ml)	LC <sub>90</sub> (ng/ml)
Cry11Aa	67 (26-111)	454 (312-760)	635 (1512-12570)
Cry4Ba	10 (5-16)	80 (50-97)	635 (311-899)
Cyt1Aa	78 (47-106)	200 (156-254)	506 (375-826)

Para calcular los valores de las LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub> utilizamos el software estadístico Probit, el cual nos permite determinar la toxicidad de ciertas toxinas hacia los organismos vivos, en este caso, larvas de mosquitos. Se expone el organismo a distintas concentraciones de toxina y se analiza la respuesta generada dependiendo de la dosis, en donde la respuesta es siempre binomial (mata/ no

mata), lo que da como resultado una curva sigmoide en la Tabla 13 se muestra el resultado de este análisis.

#### Análisis de toxicidad de las toxinas mutantes Cry11Aa y Cry4Ba.

Se analizó la toxicidad de las mutantes en larvas de cuarto instar de *Ae. aegypti*, dado que las mutantes construidas se encuentran afectadas en la cara polar de la hélice  $\alpha$ -4, la cual se propone se encuentre orientada hacia el lumen del poro y participa en la formación del canal iónico, se espera que las mutantes construidas de ambas toxinas se encuentren afectadas en su capacidad de formar canales iónicos, por lo que no serán tóxicas hacia las larvas de *Ae. aegypti*. Las larvas fueron expuestas a concentraciones muy altas (5,000 ng/ml), de cada una de las mutantes, durante 24 hrs, después de lo cual se analizó si las mutantes construidas eran tóxicas o no (Tabla 14 ).

Tabla 14. Porcentaje de mortalidad de larvas a concentración de 5000 ng/ml de toxina

TOXINA ( 5,000 ng/ml)	PORCENTAJE DE MORTALIDAD
Cry4B E159K	0%
Cry4B L152D	100%
Cry11A V142D	0%

Las mutantes E159K y V142D de las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa, respectivamente, no presentan toxicidad hacia las larvas de *Ae. aegypti*, incluso si estas se exponen a concentraciones muy altas de toxina; mientras que la mutante L152D de la toxina Cry4Ba presenta una mortalidad del 100% hacia las larvas a una concentración de 5,000 ng/ml. Por lo que se determinó la  $LC_{50}$  de la misma mediante una curva de mortalidad (dosis/respuesta), la cual fue procesada por el programa estadístico (Probit) y así establecer la  $LC_{10}$ ,  $LC_{50}$  y  $LC_{90}$ .

Tabla 15. LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub> de la toxina Cry4Ba L152D

TOXINA	LC <sub>10</sub> (ng/ml)	LC <sub>50</sub> (ng/ml)	LC <sub>90</sub> (ng/ml)
Cry4Ba L152D	28 (5-57)	119 (60-215)	497 (264-2108)

Análisis de Dominancia Negativa de las mutantes E159K y V142D.

Las mutantes E159K y V142D, de las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa, respectivamente, no presentan toxicidad hacia larvas de *Ae. Aegypti*. Estas mutantes puntuales se encuentran afectadas en la cara polar de la hélice  $\alpha$ -4 del dominio I, la cual se ha descrito, ser crucial para la inserción en la membrana y formación del canal iónico.

Con las mutantes afectadas en su toxicidad hacia larvas de mosquitos, se realizaron bioensayos con mezclas de toxina silvestre y mutante para comprobar si presentaban fenotipo de dominancia negativa.

Primero se analizó si las mutantes E159K y V142D de las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa respectivamente, presentaban el fenotipo de dominancia negativa con su respectiva toxina silvestre. Para lo cual fue necesario realizar mezclas a partir de la LC<sub>50</sub> de cada una de las toxinas silvestres. Primero se mezcló la LC<sub>50</sub> de la toxina Cry4Ba con la toxina mutante Cry4Ba E159K a una proporción 1:1 silvestre:mutante, así mismo se realizó otra mezcla con una proporción 1:0.5 silvestre:mutante, después de ser sonicadas cada una de las mezclas de los cristales de estas toxinas, se alimentaron larvas de *Ae. aegypti*. La mortalidad de las larvas se cuantificó 24 hrs después, en donde se comprobó que larvas alimentadas con la LC<sub>50</sub> de toxina Cry4Ba silvestre se tiene mortalidad era del 50%. Sin embargo con larvas alimentadas con la mezcla de ambas toxinas, silvestre y mutante, la mortalidad de las larvas disminuía considerablemente con esta mezcla (Figura 12. ). Así mismo la LC<sub>50</sub> de la toxina Cry11Aa silvestre se mezcló con la mutante Cry11Aa V142D en una proporción 1:1 y 1:0.5 silvestre:mutante, 24 hrs después de ponerlas en contacto con las larvas se cuantificó la mortalidad, y observamos que esta disminuye

considerablemente cuando fueron alimentadas con las mezclas, mientras que las que fueron alimentadas con las toxinas silvestres mostraban el 50 % de mortalidad (Figura 12.).

Para analizar si las mutantes con fenotipo de dominancia negativa podían interactuar y formar hetero-oligómeros con otras toxinas que no fueran sus toxinas silvestres, se realizaron bioensayos con larvas *Ae. aegypti*, en donde se alimentaban con una mezcla 1:1 y 1:0.5 Cry4Ba silvestre: Cry11Aa V142D (Figura 12) y notamos que esta mezcla de proteínas presentaron una disminución en su mortalidad comparadas con las que solo se alimentan con las proteínas Cry4Ba silvestres, sugiriendo que las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa pueden interactuar formando hetero-oligómeros dando como resultado un fenotipo de dominancia negativa cuando se mezcla con la toxina mutada en la hélice  $\alpha$ -4.

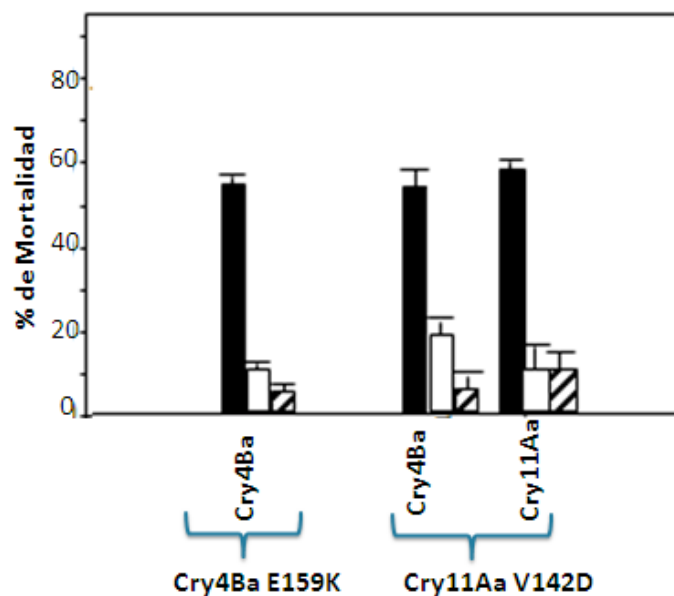


Figura 12. Gráfica de mortalidad. Barras negras indican el porcentaje de mortalidad de las toxinas silvestres, las barras blancas la mortalidad de la larvas utilizando una mezcla de 1:0.5 silvestres:mutante, y las barras rayadas utilizando una mezcla 1:1 silvestres:mutante.

#### Análisis de Dominancia Negativa de la mutante E97A de la toxina Cry11A.

Se analizó el efecto de la mutante sitio dirigida E97A de la toxina Cry11Aa en la toxicidad inducida por la toxina silvestre Cry11Aa construida en el laboratorio y reportada con anterioridad, esta mutante se localiza en la hélice alfa 3 del dominio I (Muñoz *et al.*, 2007), la cual no presenta toxicidad hacia larvas de mosquitos *Ae. aegypti*, por que se encuentra afectada

en la formación de estructuras oligoméricas. Para analizar si esta mutante tiene el fenotipo de dominancia negativa se realizaron bioensayos con larvas de cuarto instar de *Ae. aegypti*, las cuales fueron alimentadas con la mezcla de toxina silvestre con la mutante en proporción 1:0.5, 1:1, 1:10 y 1:100 toxina silvestre:mutante, tomando como referencia la LC<sub>50</sub> de la toxina silvestre (Figura 13).

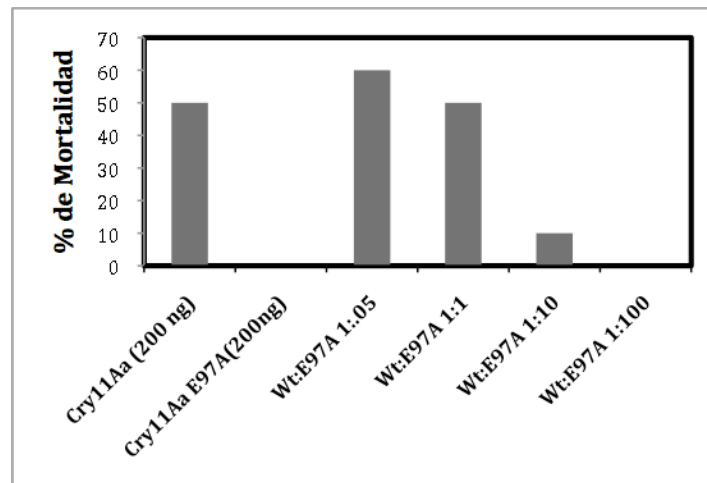


Figura 13. Bioensayos con larvas *Ae. aegypti*, para probar fenotipo de Dominancia Negativa de la toxina Cry11Aa E97A, a combinaciones 1:0.5, 1:1, 1:10, 1:100 toxina silvestre:mutante.

La mutante sitio dirigida Cry11Aa E97A no presenta un fenotipo de Dominancia Negativa, pues al encontrarse en una proporción 1:1 y 1:0.5 toxina silvestre: mutante, la toxicidad hacía las larvas se conserva igual que cuando se utiliza solo la toxina silvestre, indicando que esta mutante no es capaz de interactuar con la toxina silvestre para formar hetero-oligómeros, los cuales inhiban la toxicidad de la toxina silvestre; mientras que dosis donde la proporción toxina mutante se encuentra 10 y hasta 100 veces más que la silvestre, puede uno observar una disminución en la mortalidad de las larvas, de forma ascendente dependiendo de la concentración de la mutante, esta disminución se le atribuye a la existencia de una competencia entre las toxinas por los receptores de membrana en el intestino de las larvas.

#### Ensayos de sinergismo.

Con el fin de analizar la importancia de la hélice  $\alpha$ -4 en la toxicidad de las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa se realizaron bioensayos con las mutantes E159K y V142D en presencia de la toxina Cyt1Aa, la cual se ha reportado que sinergiza los efectos de las toxinas Cry, aumentando su toxicidad.

Para estos bioensayos se utilizó la LC<sub>10</sub> de la toxina Cyt1Aa, junto con la LC<sub>10</sub> ya sea de la toxina Cry11Aa ó Cry4Ba. Así mismo, se realizaron combinaciones de la LC<sub>10</sub> de la toxina Cyt1Aa con cada una de las mutantes que no presentaban toxicidad a diferentes concentraciones (Figura 14 y 15).

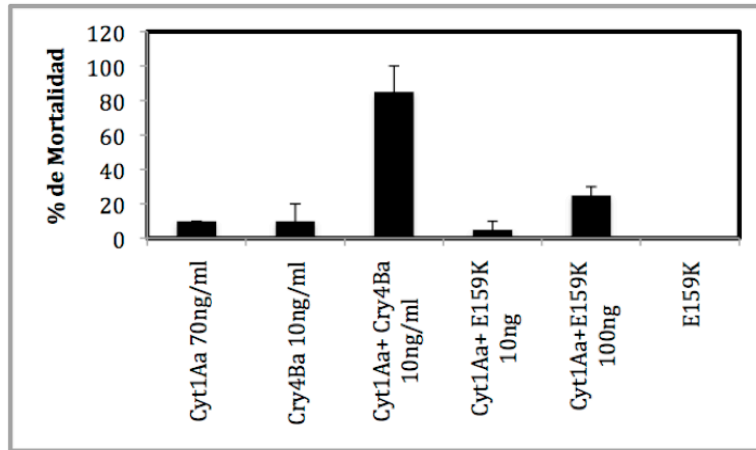


Figura 14. Ensayos de sinergismo de la mutante Cry4Ba E159K

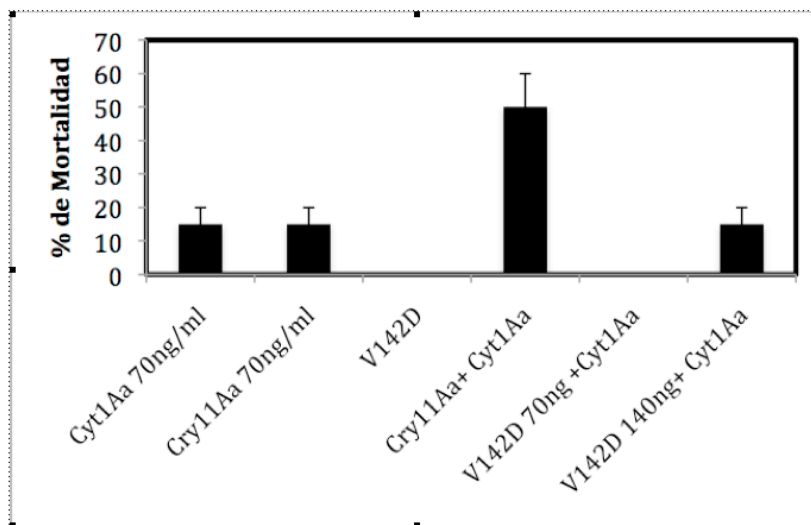


Figura 15. Ensayo de sinergismo de la toxina Cry11Aa V142D

Para las mutantes E159K y V142D afectadas en la hélice  $\alpha$ -4, la presencia de la toxina Cyt1Aa no potencia su acción sobre las larvas, al contrario que las toxinas silvestres donde su toxicidad aumenta gracias a los efectos sinérgicos que tiene la toxina Cyt sobre las toxinas silvestres.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se muestra la construcción de diversas mutantes localizadas en la hélice  $\alpha$ -4 de las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba.

Estas mutantes fueron construidas basándonos en la posición de mutantes realizadas en la toxina Cry1Ab, las cuales tenían una mutación en la hélice  $\alpha$ -4 del dominio I y presentaban incapacidad en la formación del canal iónico así como una toxicidad nula. Estas mutantes de la toxina Cry1Ab si eran capaces de formar oligómeros y sin embargo no formaban poros en membranas sintéticas y se reportó que mostraban un fenotipo de dominancia negativa. Se supuso que son capaces de formar hetero-oligómeros con las toxinas silvestres e inhibir su toxicidad (Rodríguez-Almazan *et al.*, 2009).

De acuerdo a los datos obtenidos de la toxina Cry1Ab, así como lo reportado por Girard *et al.*, 2008, en donde analizaron que la cara polar de la hélice  $\alpha$ 4 de la toxina Cry1Aa estaba involucrada en la formación de poro, nos basamos para construir las mutantes en las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba, puesto que a pesar de que entre estas toxinas su porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos es muy bajo, el plegamiento es similar en las toxinas Cry donde se ha analizado la estructura tridimensional por cristalografía y análisis de rayos-X; por lo que se especula que su mecanismo de acción es similar. Las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba presentan también una cara polar y otra hidrofóbica.

Las mutantes construidas se expresaron en una cepa de *Bacillus thuringiensis* acristalífera permitiendo la producción de cristales proteicos dentro de *Bacillus thuringiensis*, lo que hace posible que genes clonados se expresen de igual forma que lo hacen los genes cuando se encuentran en sus plásmidos nativos. En este trabajo se realizaron siete mutantes de las cuáles cuatro de ellas no se pueden visualizar en gel SDS-PAGE, lo que indica que estas mutantes resultan ser inestables y susceptibles hacia la degradación por proteasas o que estas mutantes no producen proteínas Cry, lo que sugiere que el cambio mutagénico realizado está afectando la estabilidad estructural de la proteínas; por lo cual estas mutantes no fueron analizadas.

El laboratorio del Dr. Angsuthanasombat ha reportado mutantes en la hélice  $\alpha$ -4 de varias toxinas, entre la cuales se encuentra la Cry4Ba, donde describen que el residuo R158 de la hélice  $\alpha$ -4 es indispensable para la toxicidad de esta proteína y que la mutación de este residuo cuando la proteína es expresada en *Escherichia coli*, lleva a la pérdida de toxicidad de la toxina. Apoyándonos en estos resultados construimos también la mutante R158A; sin embargo, esta mutación expresada en *Bacillus thuringiensis* no es estable, puesto que es muy susceptible a degradación por proteasas, lo que hace imposible que se pueda analizar. Es posible que las proteasas producidas por ambas bacterias sean diferentes y por eso si se expresa en *E. coli* pero no en *Bt*.

Sin embargo, de las mutantes construidas, la E159K y L152D de la toxina Cry4Ba y la V142D de la toxina Cry11Aa, mostraron que la producción proteica se lleva a cabo de la misma forma que en las toxinas silvestres, de tal forma que las proteínas se pueden observar en un gel SDS-PAGE con el mismo peso molecular que en las toxinas silvestres.

El intestino de los insectos dípteros susceptibles a las proteínas Cry, presentan un ambiente alcalino donde estas proteínas se solubilizan liberando a la protoxina, mediante una solubilización *in vitro* se analizó la estabilidad de las proteínas y comprobamos que estas mutantes llevan a cabo de forma exitosa este proceso.

Las proteínas Cry son producidas como protoxinas para su posterior procesamiento por proteasas que se encuentran en el intestino medio de las larvas susceptibles, liberando su fragmento tóxico. En la toxinas Cry4Ba se ha reportado que al ser activada con tripsina genera dos fragmentos resistentes a serin-proteasas, de 48 kDa y 16 kDa (Angsuthanasombat et al., 1993; Komano et al., 1998); mientras que en la toxina Cry11A presenta dos fragmentos resistentes a tripsina de 36 kDa y 32 kDa (Dai et al., 1993), por lo que las mutantes se procesaron con tripsina para analizar que estas se activaran de forma correcta. Conforme a los resultados de estos experimentos, podemos deducir que las mutantes construidas que si producían proteínas Cry no son susceptibles a degradación y que el residuo cambiado no afecta la estabilidad estructural de las proteínas, puesto que se pueden visualizar en gel SDS-PAGE, y tanto su solubilización como activación con tripsina se lleva a cabo de la misma forma que con las toxinas silvestres correspondientes.



Las mutantes E159K y V142D de las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa, respectivamente, presentaron una pérdida en su toxicidad cuando se analizaron por medio de bioensayos hacia larvas de *Ae. aegypti*. Por lo que se concluye que esta mutación en la hélice  $\alpha$ -4 repercute en el mecanismo de acción de estas toxinas, debido a que esta hélice como ha sido reportado junto con la hélice  $\alpha$ -5, son las que adquieren una posición transmembranal lo que les permite insertarse en la membrana y formar los canales iónicos (Gazit et al; 1998). Específicamente se especula que la hélice  $\alpha$ -4 se encuentra orientada hacia el lumen del poro y participa en la formación del poro (Masson *et al.*, 1999; Sramala *et al.*, 2001), por lo que estas toxinas al presentar una mutación puntual drástica en uno de los residuos cruciales de la hélice  $\alpha$ -4, puede que este alterando su conformación lo que les impide insertarse de forma correcta.

Las mutaciones sitio-dirigidas realizadas, se encuentran en posiciones homólogas a las que se reportaron para las toxinas Cry1Ab las cuales presentaron un fenotipo de dominancia negativa, el mecanismo de acción de las toxinas Cry se reportó para toxinas Cry1A; sin embargo, se especula que al tener un plegamiento general todas las toxinas Cry, su mecanismo de acción debe ser similar por lo que al probar si nuestras mutantes eran dominantes negativas, estas presentaron al igual que las toxinas Cry1Ab reportadas anteriormente un fenotipo de dominancia negativa, lo que nos permite inferir que las mutantes Cry11Aa y Cry4Ba también forman hetero-oligómeros con las toxinas silvestres e inhiben su toxicidad al impedir que se formaran canales iónicos.

En la naturaleza se encuentran cepas de *Bti*, las cuales son capaces de producir diferentes toxinas y al comparar la toxicidad de estas cepas con las que solo produce una variedad de toxina se puede apreciar que el efecto en las cepas nativas es mucho mayor, que el de un efecto aditivo lo que nos lleva a concluir que existe un sinergismo entre estas toxinas.

Se ha reportado que las toxinas producidas por *Bti* son capaces de sinergizar sus efectos entre ellas, como se ha demostrado ya sea con las toxinas Cyt1A y Cry11A las cuales sinergizan sus efectos aumentando su toxicidad, así como entre toxinas Cry4Ba y Cry11Aa en donde también por medio de bioensayos se ha demostrado su interacción y efectos sinérgicos. Una vez demostrado el fenotipo de dominancia negativa en las mutantes construidas, se pudo observar la interacción existente entre estas toxinas, dado que la mutante Cry11Aa V142D mostraba fenotipo de dominancia negativa sobre las toxinas silvestre Cry4Ba, lo que nos indica que estas

dos toxinas son capaces interactuar entre ellas formando hetero-oligómeros los cuales no forman canales iónicos, inhibiendo la toxicidad de la toxina silvestre. De esta manera podemos proponer que el sinergismo entre las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa observado en el mosquito, se debe a una interacción molecular entre ellas.

Respecto a los resultados de bioensayos realizados con la toxina Cry11Aa E97A localizada en la hélice  $\alpha$ -3, que resulta con la incapacidad de oligomerizar por lo cual no puede continuar con su mecanismo de acción. Esta mutante no presenta dominancia negativa al mezclarse con la toxina silvestre, este resultado reafirma la hipótesis de la importancia de la formación de oligómeros para desarrollar un fenotipo de Dominancia Negativa. Puesto que la mutante E97A no fue capaz de inhibir la toxicidad de la toxina silvestre cuando se encontraba a proporciones 1:1 ó 1:0.5 silvestre:mutante, puesto que no era capaz de formar hetero-oligómeros junto con la silvestre. Sin embargo, cuando esta mutante se encontraba a concentraciones muy altas en comparación con la silvestre 1:10 y 1:100 silvestre:mutante, la toxicidad disminuía de forma considerable, esta disminución en la toxicidad no se le puede atribuir a un fenotipo de dominancia negativa, si no que al encontrarse en concentraciones muy altas en el intestino del insecto en comparación con la silvestre, se generaba una competencia por unión a receptores, donde la probabilidad de que se uniera la toxina mutante era mucho mayor.

De acuerdo con los resultados de los bioensayos de sinergismo donde la combinación de la  $LC_{10}$  de la toxina Cyt1Aa con la  $LC_{10}$  de las toxinas silvestres, Cry11Aa y Cry4Ba, la mortalidad en las larvas se ve afectada aumentada de forma considerable indicando que existe un efecto de sinergismo, puesto que la mortalidad es mucho mayor que si observáramos un efecto de adición.

Mientras que la combinación de la  $LC_{10}$  de la toxina Cyt1Aa con las toxinas mutantes en diferentes concentraciones, no muestran de forma considerable un efecto de sinergismo, lo que nos lleva a suponer que no existe un efecto sinérgico puesto que es necesaria la formación de poro por parte de la toxina Cry para que se lleve a cabo el sinergismo entre las toxinas Cry y Cyt.

## CONCLUSIONES

.- Las mutantes E159K y L152D de la toxina Cry4Ba y la mutante V142D de la toxina Cry11Aa producen proteínas Cry, las cuales son estables a degradación por proteasas y se procesan de forma similar que las toxinas silvestres.

.- Los residuos E159 de la toxina Cry4Ba y V142 de la toxina Cry11Aa son cruciales para la toxicidad de estas toxinas.

.- Al igual que para las toxinas Cry1Ab, en las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba, mutaciones en la cara polar de la hélice  $\alpha$ -4, presentan fenotipo de dominancia negativa e inhibir la toxicidad de las toxina silvestre correspondiente.

.- Las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa son capaces de interactuar entre ellas, y formar hetero-oligomeros, los cuales presentan fenotipo de dominancia negativa, por lo tanto proponemos que el sinergismo entre estas toxinas se puede deber a que son capaces de interactuar entre ellos.

.- El fenotipo de dominancia negativa no se observa con mutantes afectadas en la hélice  $\alpha$ -3, incapaces de oligomerizar. Por lo que podemos decir que el fenotipo de Dominancia negativa observada con mutantes en la hélice  $\alpha$ -4 es una prueba de que las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa forman oligomeros semejantes a lo reportado para las toxinas Cry1A.

.- El sinergismo entre las toxinas Cry4Ba y Cyt1Aa así como el de Cry11Aa y Cyt1Aa requiere que la toxina Cry sea activa en la formación de poro ya que mutantes afectadas en la hélice  $\alpha$ -4 son incapaces de sinergizar con la toxinas Cyt1Aa.

## LITERATURA CITADA

- Abdullah, M. A.; Valaitis, A. P.; Dean, D. H. 2006. **Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus***. BMC Biochem.2006, 7, 16.
- Angsuthanasombat ,C., Crickmore, N., Ellar, DJ. 1992. **Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism in vivo**. FEMS Microbiol Lett. 1992 Jul 1;73(1-2):63-8.
- Angsuthanasombat ,C., Crickmore, N., Ellar, DJ. 1993. **Effects on toxicity of eliminating a cleavage site in a predicted interhelical loop in *Bacillus thuringiensis* CryIVB delta-endotoxin**. FEMS Microbiol Lett. 1993 Aug 1;111(2-3):255-61.
- Angsuthanasombat ,C., Keeratchamreon, S., Leetacheewa, S., Katzenmeier, G., Panyim, S.2001. **Directed mutagenesis of the *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin reveals a crucial role in larvicida activity of arginine-136 in helix 4**. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 34, No. 5, pp. 402-407.
- Armstrong JL, Rohrmann GF, Beaudreau GS. 1985. **Delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp israelensis**. J Bacteriol 1985;161:39-46.
- Aronson ,AI; Beckman, W; Dunn P. 1986. ***Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens**. Microbiol Rev. 1986 Mar;50(1):1-24.
- Aronson, A.I., Shai, Y., 2001 **Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action** . FEMS Microbiol.Lett. 195, 1-8.
- Bechtel,D.B. y Bulla Jr, L.A: 1976. **Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis***. Journal of Bacterology. 127(3): 1472-1481
- Becker, N. and Margalit, J. (1993) **Use of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis against mosquitoes and blackflies; in *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice**, Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J. and Higgs, S. (eds.), pp. 147-170, John Wiley and Sons, New York, USA.
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, SS., Soberón, M. 2004. **Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains**. Biochim Biophys Acta. 2004 Nov 17;1667(1):38-46.
- Bravo, A., Gill, SS., Soberón, M. 2007. **Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control**. Toxicon. 2007 Mar 15;49(4):423-35.

- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D. J. and Li, J. 2005. **Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications.** J. Mol. Biol. 348, 363-382.
- Boonserm, P., Min, M., Angsuthanasombat, C. and Lescar, J. 2006). **Structure of the functional form of the mosquito-larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8- angstrom resolution.** J. Bacteriol. 188, 3391-3401.
- Burges, H. D. 1982. **Control of insects by bacteria.** Parasitology 84:79-117.
- Burges, H. D., and N. W. Hussey (ed.). 1971. **Microbial control of insects and mites.** Academic Press, Inc., New York.
- Chen, J.; Aimanova, K. G.; Fernandez, L. E.; Bravo, A.; Soberon, M.; Gill, S. S. 2009a. ***Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.** Biochem. J. 2009, 424, 191-200.
- Chen, J.; Aimanova, K. G.; Pan, S.; Gill, S. S. 2009b. **Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin.** Insect Biochem. Mol. Biol. 2009, 39, 688-696.
- Choma, CT., Surewicz ,WK., Carey, PR., Pozsgay, M., Raynor, T., Kaplan, H. 1990. **Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis*. Structural implications.** Eur J Biochem. 20;189(3):523-7
- Crickmore, N., Bone, E.J., Williams, J.A. and Ellar, D.J. 1995. **Contribution of the individual components of the d-endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.** FEMS Microbiol. Lett. 131, 249–254.
- Crickmore, N.; Zeigler, DR.; Feitelson, J.; Schnepf, E.; van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Dean, DH 1998. **Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins;** Microbiol Mol Biol Rev. 1998. p. 807-813.[http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html)
- de Maagd RA, Bravo A, Crickmore N. **How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world.** Trends Genet 2001; 17: 193-9.
- Delécluse, A., Poncet, S., Klier, A. 1993. **Expression of cryIVA and cryIVB genes, independently or in combination, in a crystal- negative strain of *bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.** Applied and Environmental Microbiology, Vol.59, No. 11, pp 3922-3927.
- Derbyshire, D. J., Ellar, D. J. and Li, J. 2001. **Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine.** Acta Crystallogr. 57, 1938-1944.
- Dulmage, H. T.; Correa, J. A.; Gallegos-Morales, G.1990. **Potential for improved formulations of *Bacillus thuringiensis israelensis* through Standardization and**

fermentation development. **In: Bacterial control of mosquitoes & black flies: biochemistry, genetics & applications of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus*. Bacterial control of mosquitoes & black flies: biochemistry, genetics & applications of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus*.** 1990 pp. 110-133

Falcon, L.A. 1971. **Use of bacteria for microbial control of insects.** In: Microbial control of insects and mites (Edited by B.D. Burges and N.W. Hesse). Academic Press, New York. pp. 67-95.

Federeci, BA. 1995. **The future of microbial insecticides as vector control agents.** J Amer. Mosquito Control Assoc. 11(2): 260-268.

Fernandez-Luna, M.T. Tabashnik, B.E. Lanz-Mendoza, H. Bravo, A. Soberon, M. Miranda-Rios, J. 2010. **Single concentration tests show synergism among *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins against the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus*** *J Invertebr. Pathol.*, 104, 231-233.

Fernández, LE., Pérez, C., Segovia, L., Rodríguez, MH., Gill, SS., Bravo, A., Soberón, M. 2005. **Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop alpha-8 of domain II.** FEBS Lett. 4;579(17):3508-14.

Fernández-Luna, M. T.; Lanz-Mendoza, H.; Gill, S. S.; Bravo, A.; Soberón, M.; Miranda-Rios, J.; 2010. **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 2010, 12, (3), 746-57.

Gazit, E., La Rocca, P., Samson, M. S. and Shai, Y. (1998) **The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin are consistent with an “umbrella-like” structure of the pore.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 12289-12294.

Gubler DJ (1998). **Dengue and dengue hemorrhagic fever.** Clin Microbiol Rev; 11(3): 480–496.

Girard, F., Vachon, V., Préfontaine, G., Marceau, L., Su, Y., Larouche, G., Vincent, C., Schwartz, J.L., Masson, L., Laprade, R. 2008. **Cysteine scanning mutagenesis of alpha4, a putative pore-lining helix of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa.** Appl Environ Microbiol. 2008 May;74(9):2565-72.

Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., Soberón, M. 2002. **Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin.** FEBS Lett. 2002 Feb 27;513(2-3):242-6.

Greenwood, B.M., Fidock, D.A., Kyle, D.E., Kappe, S.H.I., Alonso, P.L., Collins, F.H., Duffy, P.E., 2008. **Malaria: progress, perils, and prospects for eradication.** J. Clin. Invest. 118, 1266–1276.

Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J. L., Brousseau, R. and Cygler, M. (1995) **Bacillus thuringiensis Cry1A(a) insecticidal toxin crystal structure and channel formation.** J. Mol. Biol. 254, 447-464.

Helgason E., Okstad, O.A., Caugant, D.A., Johansen, H.A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I., Kolstø, A.B. 2000. **Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and Bacillus thuringiensis--one species on the basis of genetic evidence.** Appl Environ Microbiol. 66(6):2627-30.

Höfte, H. and H. R. Whiteley. 1989. **Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis.** Microbiol. Rev. 53: 242-255.

Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S. y H. Van Mellaert. 1988. **Specificity of Bacillus thuringiensis d-endotoxin is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7844-7848.

Ibarra, R. J., E. **Bacterias entomopatógenas** 1998. En: IX curso nacional de control biológico (Memorias). Río Bravo, Tamaulipas, México: Sociedad Mexicana de control biológico. P.76-89

Jiménez-Juárez N, Muñoz-Garay C, Gómez I, Saab-Rincon G, Damian-Almazo JY, Gill SS, Soberón M, Bravo A. 2007 **Bacillus thuringiensis Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to Manduca sexta larvae.** J Biol Chem. 2007 Jul 20;282(29):21222-9. Epub 2007 May 30.

Kanintronkul, Y; Sriksirin, T; Angsuthanasombat, C; Kerdcharoen T. 2005 **Insertion behavior of the Bacillus thuringiensis Cry4Ba insecticidal protein into lipid monolayers.** Archives of Biochemistry and Biophysics 442 (2005) 180–186

Karamanlidou, G., Lambropoulos, A.F., Koliais, S.I., Manousis, T., Ellar, D., Kastritsis, C. 1991. **Toxicity of Bacillus thuringiensis to laboratory populations of the olive fruit fly (Dacus oleae).** Appl Environ Microbiol. 1991 Aug;57(8):2277-82

Knowles, B. H. 1994. **Mechanism of action of Bacillus thuringiensis insecticidal delta-endotoxins.** Adv. Insect Physiol. 24, 275-308.

Lacey, L. A. and A. H. Undeen. 1986. **Microbial control of black flies and mosquitoes.** Annu. Rev. Entomol. 31: 265- 296.

Lacey LA. 2007. **Bacillus thuringiensis serovariety israelensis and Bacillus sphaericus for mosquito control.** J Am Mosq Control Assoc. 2007;23(2 Suppl):133-63.

- Li, J.D., Carroll, J., Ellar, D.J. 1991. **Crystal structure of insecticidal delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution.** *Nature*. 31;353(6347):815-21.
- Li J, Pandelakis AK, Ellar DJ. 1996. **Structure of the mosquitocidal  $\delta$ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp *kyushuensis* and implications for membrane pore formation.** *J Mol Biol* 1996;257:129–152.
- Likitvivatanavong, S.; Chen, J.; Bravo, A.; Soberon, M.; Gill, S. S. **Analysis of the role of cadherin, alkaline phosphatase and aminopeptidase receptors of Cry11Ba toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Aedes aegypti*.** *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, 77, doi: 10.1128/AEM.01852-10.
- Likitvivatanavong, S., Katzenmeier, Gerd., Angsuthanasombat, Chanan. 2006. **Asn183 in  $\alpha$ 5 is essential for oligomerisation and toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 445 (2006) 46–55
- Manceva SD, Pusztai-Carey M, Russo PS, Butko P. 2005 **A detergent-like mechanism of action of the cytolytic toxin Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* var. israelensis.** *Biochemistry*. 2005 Jan 18;44(2):589-97.
- Masson, L., Tabashnik, B. E., Liu, Y. B., Brousseau, R. and Schwartz, J. L. 1999. **Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin lines the lumen of the ion channel.** *J. Biol. Chem.* 274, 31996-32000.
- Morse, R. J., Yamamoto, T. and Stroud, R. M. 2001. **Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope.** *Structure* 9, 409-417.
- Mourez, M., Lacy, D.B., Cunningham, K., Legmann, R., Sellman, B.R., Mogridge, J., Collier, R.J. 2002. **2001: a year of major advances in anthrax toxin research.** *Trends Microbiol.* 2002 Jun;10(6):287-93.
- Munoz-Garay, C. Rodriguez-Almazan, C. Aguilar, J.N. Portugal, L. Gomez, I. Saab-Rincon, G. Soberon, M. Bravo, A. 2009. **Oligomerization of Cry11Aa from *Bacillus thuringiensis* has an important role in toxicity against *Aedes aegypti*** *Appl Environ Microbiol*, 75, 7548-7550.
- Nunez-Valdez, M., Sánchez, J., Lina, L., Güereca, L. and Bravo, A. 2001. **Structural and functional studies of alpha-helix 5 region from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin.** *Biochim. Biophys. Acta* 1546, 122-131.
- Ounjai, P.; Unger, V.M.; Sigworth, F.J.; Angsuthanasombat, C. 2007. **Two conformational states of the membrane-associated *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba delta-endotoxin complex revealed by electron crystallography: implications for toxin-pore formation.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361 (2007) 890–895.



Pacheco,S. 2010 Tesis doctoral: **Papel del asa 3 del dominio II de las toxinas Cry1A's de *Bacillus thuringiensis* en el mecanismo de toxicidad: un blanco potencial para modificar el reconocimiento de sus receptores.**

Pacheco,S. Gomez,I. Arenas,I. Saab-Rincon,G. Rodriguez-Almazan,C. Gill,S.S. Bravo,A. Soberon,M. 2009. **Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a "ping-pong" binding mechanism with *Manduca sexta* aminopetidase-N and cadherin receptors** *J Biol Chem*, 284, 32750-32757.

Porter, AG., Davidson, EW., Liu, JW.1993. **Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes.** *Microbiol Rev.*57(4):838-61.

Poncet, S., A. Delecluse, A. Klier, and G. Rapoport. 1995. **Evaluation of synergistic interactions among CryIVA, CryIVB, and CryIVD toxic components of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals.** *J. Invertebr. Pathol.* 66:131–135.

Promdonkoy B, Ellar DJ. 2003 **Investigation of the pore-forming mechanism of a cytolytic  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*.** *Biochem J* 2003;374:255–259.

Promdonkoy, B., Promdonkoy, P., Panyim, S. 2005 **Co-expression of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cyt2Aa2 in *Escherichia coli* revealed high synergism against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae.** *FEMS Microbiology Letters* 252 (2005) 121–126

Puntheeranurak ,T; Stroh, C; Zhu, R; Angsuthanasombat, C; Hinterdorfer, P.2005 **Structure and distribution of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin in lipid membranes.** *Ultramicroscopy* 105 (2005) 115–124

**Regis, L.,da Silva, S., Melo-Santos, M. 2000. The Use of Bacterial Larvicides in Mosquito and Black Fly Control Programmes in Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 95, Suppl. I: 207-210

Rodriguez-Almazan,C. Zavala,L.E. Munoz-Garay,C. Jimenez-Juarez,N. Pacheco,S. Masson,L. Soberon,M. Bravo,A. 2009. **Dominant negative mutants of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin function as anti-toxins: demonstration of the role of oligomerization in toxicity** *PLoS ONE*, 4, e5545.

Scheartz,J.L., Juteau, M., Grochulsky, P., Cygler, M., Préfontaine , G., Brousseau, R., Masson, L., 1997. **Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering.** *FEBS Lett.* 410, 397-402.

Schwartz, J.L., Garneau, L., Masson, L., Brousseau, R. y E. Rousseaueu. 1993. **Lepidopteran-specific  $\delta$ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers.** *J. Membr. Biol.* 132, 53-62

Schwartz, J. L., Lu, Y, J., Sohnlein, P., Brousseau, R., Laprade, R., Masson, L. Adang, M. J. 1997a. **Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus Thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors.** FEBS Letters. 412: 270-276.

Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, *et al.* ***Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins.** Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62: 775-806.

Sellman, BR; Mourez, M; Collier, RJ.2001 **Dominant-negative mutants of a toxin subunit: an approach to therapy of anthrax.** Science. 2001 Apr 27;292(5517):695-7.

Shelton, A. M., Zhao, J.-Z., and Roush, R. T. 2002. **Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants.** Annu. Rev. Entomol. 47: 845-881.

Sramala, I; Leetacheewa, S; Krittanai, C; Katzenmeier, G; Panyim, S. and Angsuthanasombat, C. 2001. **Charged residue screening in helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B toxin reveals one critical residue for larvicidal activity.** J. Biochem. Mol. Biol and Biophys. Vol. 5, pp 219-225.

Soberon,M. Fernandez,L.E. Perez,C. Gill,S.S. Bravo,A. 2007. **Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins** *Toxicon*, 49, 597-600.

Tapaneeyakorn, S; Pornwiroon, W; Katzenmeier, G; Angsuthanasombat C. 2005. **Structural requirements of the unique disulphide bond and the proline-rich motif within the alpha4-alpha5 loop for larvicidal activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa delta-endotoxin.** Biochem Biophys Res Commun. 2005 May 6;330(2):519-25.

Thomas, W. E., and Ellar, D. J. 1983. ***Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo,** *J. Cell Sci.* 60, 181-197

Tiewsirir,K; Angsuthanasombat, C. 2007. **Structurally conserved aromaticity of Tyr 249 and Phe 264 in helix 7 is important for toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin.** Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 40, No. 2, pp. 163-171.

Tiewsirir,K; Fischer, WB; Angsuthanasombat, C. 2009 **Lipid-induced conformation of helix 7 from the pore-forming domain of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin: Implications for toxicity mechanism.** Archives of Biochemistry and Biophysics 482 (2009) 17–24.

Whalon, M. E. and Wingerd, B. A. 2003. **Bt: mode of action and use.** Arch. Insect Biochem. Physiol. 54, 200-211.

Wu, D., Johnson, J.J., Federeci, B.A., 1994. **Synergism of mosquitocidal toxicity between Cyt1A and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*.** Mol. Microbiol. 13, 965-972.

Wu, D., Aronsosn, A.I., 1992. **Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin involved in toxicity and specificity.** J. Biol. Chem. 267, 2311-2317.

Zhang, R.; Hua, G.; Andacht, T. M.; Adang, M. J. **A 106-kDa aminopeptidase is a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin in the mosquito *Anopheles gambiae*.** Biochemistry 2008, 47, 11263-11272.

# Dominant Negative Phenotype of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab, Cry11Aa and Cry4Ba Mutants Suggest Hetero-Oligomer Formation among Different Cry Toxins

Daniela Carmona<sup>1</sup>, Claudia Rodríguez-Almazán<sup>1</sup>, Carlos Muñoz-Garay<sup>1</sup>, Leivi Portugal<sup>1</sup>, Claudia Pérez<sup>1</sup>, Ruud A. de Maagd<sup>2</sup>, Petra Bakker<sup>2</sup>, Mario Soberón<sup>1</sup>, Alejandra Bravo<sup>1\*</sup>

**1** Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico, **2** Bioscience, Plant Research International, Wageningen, The Netherlands

## Abstract

**Background:** *Bacillus thuringiensis* Cry toxins are used worldwide in the control of different insect pests important in agriculture or in human health. The Cry proteins are pore-forming toxins that affect the midgut cell of target insects. It was shown that non-toxic Cry1Ab helix  $\alpha$ -4 mutants had a dominant negative (DN) phenotype inhibiting the toxicity of wildtype Cry1Ab when used in equimolar or sub-stoichiometric ratios (1:1, 0.5:1, mutant:wt) indicating that oligomer formation is a key step in toxicity of Cry toxins.

**Methodology/Principal Findings:** The DN Cry1Ab-D136N/T143D mutant that is able to block toxicity of Cry1Ab toxin, was used to analyze its capacity to block the activity against *Manduca sexta* larvae of other Cry1 toxins, such as Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea and Cry1Fa. Cry1Ab-DN mutant inhibited toxicity of Cry1Aa, Cry1Ac and Cry1Fa. In addition, we isolated mutants in helix  $\alpha$ -4 of Cry4Ba and Cry11Aa, and demonstrate that Cry4Ba-E159K and Cry11Aa-V142D are inactive and completely block the toxicity against *Aedes aegypti* of both wildtype toxins, when used at sub-stoichiometric ratios, confirming a DN phenotype. As controls we analyzed Cry1Ab-R99A or Cry11Aa-E97A mutants that are located in helix  $\alpha$ -3 and are affected in toxin oligomerization. These mutants do not show a DN phenotype but were able to block toxicity when used in 10:1 or 100:1 ratios (mutant:wt) probably by competition of binding with toxin receptors.

**Conclusions/Significance:** We show that DN phenotype can be observed among different Cry toxins suggesting that may interact *in vivo* forming hetero-oligomers. The DN phenotype cannot be observed in mutants affected in oligomerization, suggesting that this step is important to inhibit toxicity of other toxins.

**Citation:** Carmona D, Rodríguez-Almazán C, Muñoz-Garay C, Portugal L, Pérez C, et al. (2011) Dominant Negative Phenotype of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab, Cry11Aa and Cry4Ba Mutants Suggest Hetero-Oligomer Formation among Different Cry Toxins. PLoS ONE 6(5): e19952. doi:10.1371/journal.pone.0019952

**Editor:** Alfredo Herrera-Estrella, Cinvestav, Mexico

**Received:** March 16, 2011; **Accepted:** April 7, 2011; **Published:** May 16, 2011

**Copyright:** © 2011 Carmona et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by CONACyT 024967, 224926 ([www.conacyt.mx](http://www.conacyt.mx)); DGAPA-UNAM IN206209 (<http://dgapa.unam.mx/>); and National Institutes of Health, 1R01 AI066014 ([www.nih.gov](http://www.nih.gov)). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** Ruud A. de Maagd and Petra Bakker were employees of Plant Research International when they collaborated with the authors to perform this work. This does not alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials.

\* E-mail: bravo@ibt.unam.mx

## Introduction

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) bacteria produce insecticidal crystal (Cry) proteins that are used in the control of insect pests important for agricultural crops and against vectors of human diseases [1]. Cry toxins have been characterized as pore-forming toxins. Their mechanism of action involves specific interactions with several receptors and insertion of part of the toxin into the apical membrane of insect midgut cells, forming pores that finally kill the larvae [2]. It was shown that Cry1A binding to cadherin receptor induced the cleavage of an amino-terminal region including helix  $\alpha$ -1 leading to toxin oligomerization. Cry oligomers bind to aminopeptidase or alkaline phosphatase receptors [3,4], and inserts into the membrane to form toxic pores [1,2]. Helix  $\alpha$ -3 of Cry toxin is involved in toxin oligomerization [5] and helix  $\alpha$ -4 in membrane insertion and pore formation [6]. Mutants affected in helices  $\alpha$ -3 or  $\alpha$ -4 are thus affected in pore formation activity and completely lost toxicity against their target insect [5–7].

Recently it was reported that some non-toxic Cry1Ab helix  $\alpha$ -4 mutants showed a dominant negative (DN) phenotype, since they inhibited wildtype insecticidal activity at substoichiometric ratios [8]. These mutants were able to form homo-oligomers but were affected in their pore formation activity and it was proposed that monomers of the Cry1Ab-DN mutants are able to form oligomeric structures with wildtype Cry1Ab functioning as effective antitoxins that block toxicity of the wildtype toxin and then have the potential to be used to protect special ecosystems from the potential effects of Cry toxins on non-target insects [8]. Similar antitoxins from different pore forming toxins that affect mammalian cells as protective antigen PA subunit of anthrax toxin from *Bacillus anthracis* [9,10], ClyA Cytotoxin from *Escherichia coli* [11] and vacuolating toxin VacA from *Helicobacter pylori* [12] have also been reported. DN inhibitors of PA, ClyA and VacA, are inactive mutant-toxins that are able to form oligomer structures but are affected in their pore formation activity. It was suggested that they work as powerful inhibitors since they are able to co-assemble into

oligomers together with their corresponding wildtype toxin resulting in an effective inactivation of pore formation activity of their wildtype toxins resulting in the complete loss of toxicity [9–12]. In addition a dominant-negative mutant of HCN channels present in the ventricular myocardium were also reported. The nonfunctional HCN2 mutations affected pore formation of the channel and suppressed HCN2 wildtype activity in a dominant-negative manner [13]. In all these reports, the DN phenotype has been regarded as compelling evidence for *in vivo* oligomer formation and for this reason they were proposed as anti-toxins to control the diseases that these bacterial-toxins induce in mammalian organisms or to control arrhythmogenesis and cardiac pacing [9–13].

*Bt* subsp. *israelensis* produce different Cry toxins (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa and Cry11Aa) that are active against mosquito larvae [14]. It was proposed that mosquitocidal Cry toxins share a similar mechanism of action with Cry1A toxins, that are active against lepidopteran insect pests, since similar Cry-binding molecules have been identified in mosquitoes, including cadherin [15,16], aminopeptidase [17,18], and alkaline phosphatase [19]. Interestingly, several reports show a synergism between Cry11Aa and Cry4Ba although the molecular mechanism of this synergistic effect remains unknown [20–22]. Cry11A and Cry4Ba mutants in helix  $\alpha$ -4 were affected in toxicity against mosquito larvae [23,24].

In this work we used the previously described non-toxic Cry1Ab-D136N/T143D mutant to analyze if its DN phenotype extends to other Cry1 toxins. Cry1Ab-D136N/T143D was a potent inhibitor of Cry1Ab *in vivo* and was affected in pore formation but not in toxin-oligomerization [8]. We analyzed if this DN-mutant was able to inhibit the toxicity of the highly related Cry1Aa and Cry1Ac toxins and also of other Cry1 toxins that are active against *M. sexta* (Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea and Cry1Fa). In addition we isolated helix  $\alpha$ -4 mutants of Cry4Ba and Cry11Aa and analyzed their DN phenotype with both wt Cry4Ba and Cry11Aa toxins. Our results show that Cry1Ab DN mutant functions as antitoxin of Cry1Aa, Cry1Ac and Cry1Fa, while Cry11Aa and Cry4Ba DN mutants inhibit the toxicity of both Cry11Aa and Cry4Ba toxins. These results suggest that in some cases *Bt* Cry toxins have the potential to form hetero-oligomers.

## Results

### In vivo inhibition of toxin insecticidal activity

To compare the potency of the Cry1Ab helix  $\alpha$ -4 mutant D136N/T143D as DN inhibitor of other Cry1 toxins, we tested its ability to inhibit the toxicity of other Cry1 toxins that are also active against *M. sexta* such as Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea and Cry1Fa. We first determined the medium lethal concentration (LC<sub>50</sub> value) of each protoxin performing bioassays against first instar *M. sexta* larvae using a series of different protoxin concentrations (Table 1). Then we fed *M. sexta* larvae with mixtures of Cry1Ab-D136N/T143D mutant with the different wildtype Cry protoxins (at their corresponding LC<sub>50</sub> concentration) in a protein ratio 0.5:1 (mutant:wildtype). Figure 1A shows that Cry1Ab-D136N/T143D mutant blocked the action of Cry1Aa, Cry1Ac and Cry1Fa toxins, but did not affect the toxicity of Cry1Ca, Cry1D or Cry1Ea. The inhibition of toxicity of Cry1Aa, Cry1Ac and Cry1Fa toxins by Cry1Ab-D136N/T143D mutant was observed at sub-stoichiometric ratio.

We analyzed if the DN phenotype could be observed with a different inactive mutant affected in oligomerization such as the Cry1Ab-R99A located in helix  $\alpha$ -3 of domain I [5]. Figure 1B shows that this mutant did not have a DN phenotype, since it was unable to inhibit the toxicity of the wildtype toxin when used a

**Table 1.** Toxicity of Cry toxins.

Protoxin	LC <sub>50</sub> (95% fiducial limits)	Target insect
Cry1Aa	3.7 (2.8–4.7) <sup>a</sup>	<i>Manduca sexta</i>
Cry1Ab	2.9 (1.8–4.8) <sup>a</sup>	<i>Manduca sexta</i>
Cry1Ac	1.8 (2.0–3.6) <sup>a</sup>	<i>Manduca sexta</i>
Cry1Ca	52.5 (41.6–75.5) <sup>a</sup>	<i>Manduca sexta</i>
Cry1Da	25.1 (19.9–44.1) <sup>a</sup>	<i>Manduca sexta</i>
Cry1Ea	225.0 (190.1–280.8) <sup>a</sup>	<i>Manduca sexta</i>
Cry1Fa	14.1 (8.2–22.3) <sup>a</sup>	<i>Manduca sexta</i>
Cry4Ba	83.7 (55.4–130.2) <sup>b</sup>	<i>Aedes aegypti</i>
Cry4Ba L152D	108.1 (79.2–190.4) <sup>b</sup>	<i>Aedes aegypti</i>
Cry4Ba-E159K	>2,000 <sup>b</sup>	<i>Aedes aegypti</i>
Cry11Aa	454.11 (312.7–760.6) <sup>b</sup>	<i>Aedes aegypti</i>
Cry11Aa-V142D	>2,000 <sup>b</sup>	<i>Aedes aegypti</i>

<sup>a</sup>ng/cm<sup>2</sup>;

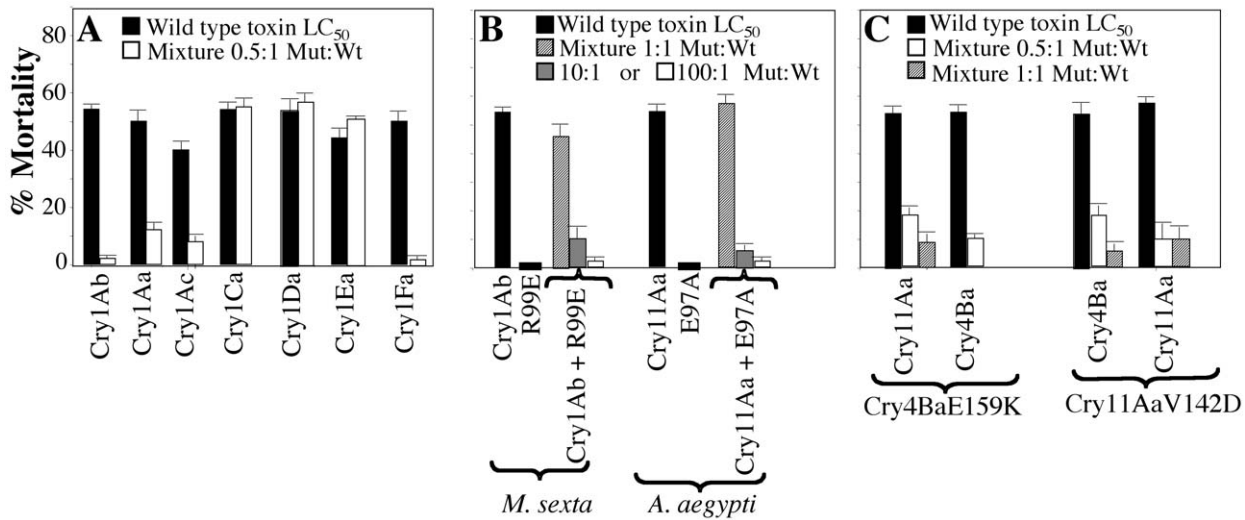
<sup>b</sup>ng/ml.

doi:10.1371/journal.pone.0019952.t001

sub-stoichiometric or equimolar ratios. In contrast, when we tested higher concentrations of the Cry1Ab-R99A mutant, up to 10 or 100 fold higher concentration of the mutant than the wildtype toxin; we found that Cry1Ab-R99A was able to inhibit toxicity of wildtype toxin (Fig. 1B). This is probably due to binding competition for toxin receptors since mutation of Cry1Ab-R99A is located in helix  $\alpha$ -3, a region that is not involved in toxin interaction with receptors. These data suggest that binding competition requires much higher concentrations of the competitor, indicating a complete different mechanism than DN phenotype.

### Isolation of Cry4Ab and Cry11Aa mutants in helix $\alpha$ -4

As mentioned previously the mosquitocidal Cry11Aa and Cry4Ba have a synergistic effect when fed together to certain mosquito larvae [20–22]. In order to analyze if these toxins have a similar mechanism of action than Cry1A toxins, we isolated four mutants in helix  $\alpha$ -4 of Cry4Ba (A145C, L152D, E159K and R158A) and three mutants in Cry11Aa (N128D, Q135C and V142D). Some of these mutants were highly susceptible to trypsin degradation (Cry4Ba-A145C, Cry4Ba-R158A, Cry11Aa-N128D and Cry11Aa-Q135C) and were not further analyzed. The crystal inclusions of Cry4Ba-L152D, Cry4Ba-E159K and Cry11Aa-V142D mutants were purified and protoxins activated with trypsin, as described in materials and methods. Figure 2 shows the SDS-PAGE electrophoretic profile of protoxins and activated toxins of Cry4Ba and Cry11Aa mutant toxins analyzed in this work. The Cry4Ba mutants produced a similar 40 and 18 kDa activated toxin fragment as the wildtype and the Cry11Aa mutant also showed a similar activation profile of 36 and 32 kDa as the Cry11Aa, indicating no major effects in toxin structure stability. The insecticidal activity of these wildtype and mutant proteins was analyzed in bioassays against *Aedes aegypti* larvae as described, using purified crystal suspensions that were sonicated to avoid aggregation [25]. The Cry4Ba showed a lower LC<sub>50</sub> value than Cry11Aa toxin (Table 1). The Cry4Ba-L152D mutant was active against *A. aegypti* while the mutants Cry4Ba-E159K and Cry11Aa-V142D were inactive (Table 1). To test the ability of Cry4Ba-E159K and Cry11Aa-V142D to inhibit the toxicity of their corresponding wildtype toxins we used an equimolar (1:1) as well



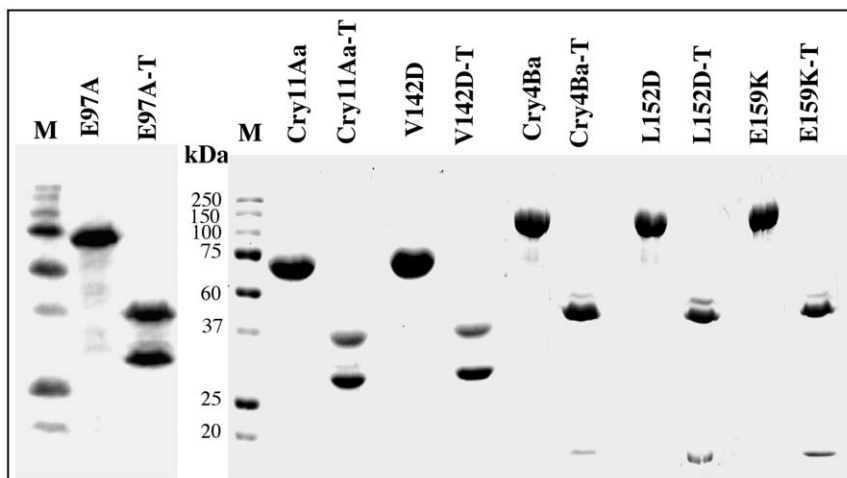
**Figure 1. In vivo analysis of the Dominant Negative phenotype of Cry mutants.** Panel A, Toxicity assays against *Manduca sexta* larvae of different Cry toxins at their corresponding LC<sub>50</sub> concentration (see table 1) (black bars) and mixtures of Cry1Ab-D136N/T143D mutant with these wildtype Cry toxins in a protein ratio 0.5:1 (mutant:wildtype) (white bars). Panel B, Toxicity assays against *Manduca sexta* or *Aedes aegypti* larvae of Cry1Ab or Cry11Aa at their corresponding LC<sub>50</sub> concentration (black bar) or in a mixture with Cry1Ab-R99E or Cry11Aa-E97A mutant toxins in a protein ratio 1:1 (dashed bars), 10:1 (mutant:wildtype) (grey bars) or 100:1 (mutant:wildtype) (white bars). Panel C, Toxicity assays against *Aedes aegypti* larvae of Cry4Ba or Cry11Aa at their corresponding LC<sub>50</sub> concentration (black bar) or in a mixture with mutant toxins in a protein ratio 0.5:1 (mutant:wildtype) (white bars) or 1:1 (dashed bars). doi:10.1371/journal.pone.0019952.g001

as a lower ratio (0.5:1) of mutant:wildtype to feed the mosquito larvae. Figure 1C shows that both mutant toxins were able to block the action of their corresponding wildtype toxin showing a DN phenotype since inhibition was observed at sub-stoichiometric ratios. We finally analyzed if Cry4Ba-E159K was able to inhibit the toxicity of Cry11Aa and if Cry11Aa-V142D could affect toxicity of Cry4Ba against *A. aegypti*. Figure 1C shows that these mutants blocked toxicity of a different wildtype toxin suggesting that *in vivo* Cry11Aa and Cry4Ba toxins may interact in *A. aegypti*. However, when we used the previously described non-toxic Cry11Aa-E97A mutant, located in helix  $\alpha$ -3 that is affected in oligomerization [26], we found that this mutant did not show a DN phenotype since it was unable to inhibit the toxicity of the

wildtype toxin when tested at 0.5:1 or 1:1 ratios. Similarly to the data of Cry1Ab-R99A mutant described above, we found that Cry11Aa-E97A mutant was able to block toxicity at 10:1 or 100:1 ratios (mutant:wt) suggesting that this inhibition is due to a different mechanism, most probably involving binding competition.

**Discussion**

Inactive mutants of PA subunit of the anthrax toxin were among the first reports of DN mutants in pore forming toxins. These mutants were able to form oligomer structures but were affected in their pore formation activity, working as powerful inhibitors of anthrax toxin since they co-assemble into hetero-



**Figure 2. Analysis of Cry4Ba and Cry11Aa proteins in SDS-PAGE.** Protoxins and trypsin-activated proteins were stained with Coomassie blue. Molecular weight markers used in all SDS-PAGE were precision pre-stained plus standards all blue (BioRad, Hercules CA). Soluble protoxins are Cry11Aa, E97A, V142D, Cry4Ba, L152D and E159K. Trypsin activated toxins are Cry11Aa-T, E97A-T, V142D-T, Cry4Ba-T, L152D-T and E159K-T. doi:10.1371/journal.pone.0019952.g002

oligomers with the wildtype toxin resulting in an effective inactivation of pore formation and toxicity [9,10]. Similar results were obtained with other pore forming toxins such as VacA and ClyA, and in HCN ionic channels, where mutants affected in pore formation but not in oligomerization also showed a DN phenotype [11–13]. It was proposed that the underlying mechanism involves the hetero-oligomerization between the mutant toxins with the wildtype resulting in a DN effect, blocking the wildtype toxicity [9–13].

The mutant Cry1Ab-D136N/T143D in helix  $\alpha$ -4, analyzed in this study, was previously shown not to impair toxin assembly in a pre-pore structure, but rather to block an essential conformational transition of the assembled complex necessary for membrane insertion and pore formation [8]. It was reported that this mutant inhibited the activity of wildtype Cry1Ab *in vivo* against *M. sexta* larvae and *in vitro* by analyzing pore formation in black lipid bilayers [8].

In this work we hypothesized that if the DN phenotype of Cry1Ab-D136N/T143D extends to different Cry toxins this could suggest hetero-oligomerization among different Cry toxins. We thus analyzed if the Cry1Ab-D136N/T143D mutant was capable of blocking the toxicity of other Cry1 toxins when mixed at stoichiometric ratios.

Our data show that DN mutant of Cry1Ab was able to inhibit toxicity of Cry1Aa, Cry1Ac and Cry1Fa toxins at 0.5:1 ratio (mutant:wt). These data suggest that the molecular mechanism observed in DN phenotype involves co-assembling between different Cry toxin-monomers forming hetero-oligomeric structures. In addition, we isolated mutants in helix  $\alpha$ -4 of Cry4Ba and Cry11Aa toxins that are specific against mosquitoes. Some of these mutants lost toxicity and also showed a clear DN phenotype when mixed with their corresponding wildtype toxin. The DN phenotype was also observed between the Cry4Ba-E159K mutant and Cry11Aa or the Cry11Aa-V142D mutant and Cry4Ba wildtype suggesting interaction between these two toxins. These data resulted quite interesting since it was reported that Cry11Aa and Cry4Ba have synergistic activity [19–21] showing in some cases up to 10 fold higher activity in the mixture than the expected mortality from the individual toxins.

Recently, a 3D-structure model of the Cry4Aa pre-pore oligomer was published, based in the structure of the trimeric unit cell of the X-ray crystal structure of the Cry4Ba toxin [27]. In this structural model the authors proposed that the Cry4Aa oligomer is stabilized by some residues of helices  $\alpha$ -3,  $\alpha$ -4 and  $\alpha$ -6 and that pore formation may involved and insertion into the lipid bilayer of the hairpin conformed by helices  $\alpha$ -4 and  $\alpha$ -5 of domain I, while domains II and III remain in the membrane surface [27]. Comparison of amino acid sequences of helices  $\alpha$ -3,  $\alpha$ -4 and  $\alpha$ -6 among the different Cry toxins used in this study did not revealed any apparent explanation for the specificity of the DN phenotype, indicating that primary sequence of these domain I regions do not determine the binding interaction among different Cry toxins and/or that other toxin regions are involved in this interactions, this remains to be analyzed.

The role of toxin oligomerization in inducing the DN phenotype was supported by the fact that Cry1Ab-R99A or Cry11Aa-E97A mutants affected in the process of oligomerization [5,26] did not induce a DN response since they were unable to inhibit toxicity of their corresponding wildtype toxin at stoichiometric ratios neither at equimolar ratios. These data strongly suggest that oligomerization among DN mutants and wildtype monomers, represents the mechanism responsible of the DN phenotype.

Our results show that helix  $\alpha$ -3 mutants, Cry1Ab-R99A or Cry11Aa-E97A, do not have a DN phenotype but inhibited

toxicity of their corresponding wt toxin when tested at higher ratios such as 10:1 or 100:1 (mutant:wildtype), suggesting competition for receptor binding. These data are similar to some reported mutants of the anthrax toxin, since a PA mutant affected in toxin oligomerization did not show a DN phenotype since it was unable to form hetero-oligomers with the wildtype toxin [28]. However, this mutant still bound to, and competed, receptor binding causing a competitive inhibition of anthrax toxin action at 10:1 ratio [28].

Although the physiological role of hetero-oligomerization among different toxins remains to be analyzed, it is interesting to note that synergism between different Cry toxins such as Cry4Ba and Cry11Aa against mosquito larvae have been reported [20–22]. The synergism between Cry1A toxins has been also documented before. Specifically, Cry1Ab and Cry1Ac synergized against *Chilo partellus* larvae showing up to five fold higher activity when both toxins are present in the bioassay [29]. Also it was reported that Cry1Aa and Cry1Ac have a synergistic effect against *Lymantria dispar* larvae, increasing their toxicity up to 4.9 fold and in this case voltage clamping assays demonstrated that combination of both toxins resulted in a greater pore formation activity than the individual toxins [30]. In the case of Cry1A and Cry1Fa, there are no data of synergism between them. However, when both toxins were expressed in Bt-cotton plants, the control of *Helicoverpa zea* and *Spodoptera* species was more effective than single protein Bt-cotton plants [31]. Overall, these data may suggest that synergistic effect could be related to the interaction of different Cry toxins, forming a complex that is more effective in killing the target larvae. Most Bt isolates produce more than one Cry toxin, thus, it is tempting to speculate that hetero-oligomerization of Cry toxins could have been selected in nature as a mechanism to modulate toxicity and insect specificity of these family of pore-forming toxins.

## Materials and methods

### Construction of Cry4Ba and Cry11Aa mutants

Mutants in helix  $\alpha$ -4 of Cry4Ba (A145C, L152D, E159K and R158A) and Cry11Aa (N128D, Q135C and V142D) were produced by site-directed mutagenesis (Quick-Change, Stratagene, La Jolla, CA) using pCG6 plasmid [32] containing *cry11Aa* gene or pHT611 plasmid [33] harboring the *cry4Ba* gene as templates. Appropriate oligonucleotides were synthesized for each mutant. Automated DNA sequencing at Instituto de Biotecnología-UNAM's facilities verified the single point mutations. Acrystalliferous Bt strain 407 was transformed with recombinant plasmids as reported [34] and selected in Luria broth at 30°C supplemented with 10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> erythromycin.

### Purification of Cry1, Cry4Ba and Cry11Aa toxins

The inclusion bodies of Cry1C, Cry1Da, Cry1Ea and Cry1Fa protoxins were obtained as recombinant proteins expressed in *Escherichia coli* as reported [35]. Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac were produced in *Bt* bacteria as described [36]. Protoxins were solubilized in alkaline buffer 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol, pH 10.5.

Bt transformant strains of Cry4Ba and Cry11Aa proteins were grown at 30°C in nutrient broth sporulation medium with erythromycin until complete sporulation. Crystal inclusions were purified by sucrose gradients [37]. Cry4Ba protoxin was solubilized in alkaline buffer and activated with trypsin in a mass ratio of 1:20 w/w trypsin/protoxin, for 4 h at 37°C. Cry11Aa was solubilized in 100 mM NaOH, 1 h at 4°C. The pH was equilibrated at pH 8.6 with same volume of 1M Tris HCl pH 8

and activated with trypsin (1:50 w/w trypsin/prototoxin) for 2 h at 25°C. Phenylmethylsulfonyl-fluoride (1 mM final concentration) was added to stop proteolysis. Finally proteins were visualized in SDS-PAGE gels stained with Coomassie blue. Molecular weight markers were precision pre-stained plus standards all blue (BioRad, Hercules CA).

## Bioassays

Bioassays of Cry1A protoxins were performed with first instar *M. sexta* larvae. Soluble protoxins (from 0.1 to 2000 ng/cm<sup>2</sup>) were applied onto the diet surface of 24-well plates, using 24 larvae per toxin concentration in triplicate. Protein was determined by the Bradford assay. Mortality was recorded after seven days and lethal concentration (LC<sub>50</sub>) value in ng of toxin per cm<sup>2</sup> of diet was estimated by Probit (Polo-PC LeOr software).

The bioassays of Cry4Ba and Cry11Aa against fourth instar *A. aegypti* larvae were done with purified crystal suspensions that were sonicated to avoid aggregation [25]. Ten different concentrations of purified crystals were used (50–6000 ng/mL) in 100 mL of dechlorinated water containing 20 early fourth-instar larvae.

## References

- Bravo A, Soberón M, Gill SS (2005) *Bacillus thuringiensis*: mechanism and use. In Comprehensive Molecular Insect Science. Li Gilbert, SS Gill, K Iatrou, eds. Elsevier, Vol 6. pp 175–206. ISBN: 0-44-451516-X.
- Soberón M, Gill SS, Bravo A (2009) Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cell Mol Life Sci* 66: 1337–1349.
- Pacheco S, Gómez I, Arenas I, Saab-Rincon G, Rodríguez-Almazán C, et al. (2009) Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a “ping pong” binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. *J Biol Chem* 284: 32750–32757.
- Arenas I, Bravo A, Soberón M, Gómez I (2010) Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *J Biol Chem* 285: 12497–12503.
- Jiménez-Juárez N, Muñoz-Garay C, Gómez I, Saab-Rincon G, Damian-Alamazo JY, et al. (2007) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non toxic to *Manduca sexta* larvae. *J Biol Chem* 282: 21222–21229.
- Girard F, Vachon V, Prefontaine G, Marceau L, Su Y, et al. (2008) Cysteine scanning mutagenesis of  $\alpha$ -4 a putative pore lining helix of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. *Appl Environ Microbiol* 74: 2566–2572.
- Vachon V, Prefontaine G, Coux F, Rang C, Marceau M, et al. (2002) Role of helix 3 in pore formation by *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. *Biochemistry* 41: 6178–6184.
- Rodríguez-Almazán C, Zavala LE, Muñoz-Garay C, Jiménez-Juárez N, Pacheco S, et al. (2009) Dominant negative mutants of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin function as anti-toxins: Demonstration of the role of oligomerization in toxicity. *PLoS ONE* 4: e5545.
- Mourez M, Yan M, Lacy DB, Dillon L, Bentsen L, et al. (2003) Mapping dominant-negative mutations of anthrax protective antigen by scanning mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 13803–13808.
- Sellman BR, Mourez M, Collier RJ (2001) Dominant-negative mutants of a toxin subunit: an approach to therapy of anthrax. *Science* 292: 695–697.
- Wai SN, Westermarck M, Oscarsson J, Jass J, Maier E, et al. (2003) Characterization of dominantly negative mutant ClyA Cytotoxin proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185: 5491–5499.
- Vinion-Dubiel A, McClain MS, Czajkowsky DM, Iwamoto HYD, Cao P, et al. (1999) A dominant negative mutant of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin Vac A inhibits VacA-induced cell vacuolation. *J Biol Chem* 274: 37736–37742.
- Er F, Larbig R, Ludwig A, Biel M, Hofmann F, et al. (2003) Dominant-negative suppression of HCN channels markedly reduces the native pacemaker current *I<sub>f</sub>* and undermines spontaneous beating of neonatal cardiomyocytes. *Circulation* 107: 485–489.
- Hernandez-Soto A, Del Rincón-Castro MC, Espinoza AM, Ibarra JE (2009) Parasporal body formation via overexpression of the Cry10Aa toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Cry10Aa-Cyt1Aa synergism. *Appl Environ Microbiol* 75: 4661–4667.
- Hua G, Zhang R, Abdullah MA, Adang MJ (2008) *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. *Biochemistry* 47: 5101–5110.
- Chen J, Aimanova K, Fernandez L, Bravo A, Soberón M, et al. (2009) *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biochem J* 424: 191–200.
- Abdullah MA, Valaitis AP, Dean DH (2006) Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochem* 7: 16.
- Zhang R, Hua G, Andacht TM, Adang MJ (2008) A 106-kDa aminopeptidase is a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Biochemistry* 47: 11263–11272.
- Fernandez LE, Aimanova KG, Gill SS, Bravo A, Soberón M (2006) A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem J* 394: 77–84.
- Fernandez-Luna MT, Tabaschnik B, Lanz-Mendoza H, Bravo A, Soberón M, et al. (2010) Single-Concentration Tests Show Synergism Among *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Toxins Against the Malaria Vector Mosquito *Anopheles albimanus*. *J Invertebr Pathol* 104: 231–233.
- Poncet S, Delecluse A, Klier A, Rapoport G (1995) Evaluation of synergistic interaction among CryIVA, CryIVB and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subs *israelensis* crystals. *J Invertebr Pathol* 66: 131–135.
- Crickmore N, Bone EJ, Williams JA, Ellar D (1995) Contribution of the individual components of the  $\delta$ -endotoxin crystal to the mosquitoicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*. *FEMS microbial Lett* 131: 249–254.
- Angsuthanasombat Ch, Keeratchamreon S, Leetacheewa S, Katzenmeier G, Panyim S (2001) Directed mutagenesis of the *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin reveals a crucial role in larvicidal activity of arginine136 in helix 4. *J Biochem Mol Biol* 34: 402–407.
- Shamala I, Leetacheewa S, Krittanai Ch, Katzenmeier G, Panyim S, et al. (2001) Charged residue screening in helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B toxin reveals one critical residue for larvicidal activity. *J Biochem Mol Biol Biophys* 5: 219–225.
- Canton PE, Reyes EZ, RuizdeEscudero I, Bravo A, Soberón M (2010) Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. *Peptides* 32: 595–600.
- Muñoz-Garay C, Rodríguez-Almazán C, Aguilar JN, Portugal L, Gómez I, et al. (2009) Oligomerization of Cry11Aa from *Bacillus thuringiensis* has an important role in toxicity against *Aedes aegypti*. *Appl Environ Microbiol* 75: 7548–7550.
- Tavechareonkool T, Angsuthanasombat Ch, Kantchanawarin Ch (2010) Combined molecular dynamics and continuum solvent studies of the pre-pore Cry4Aa trimer suggest its stability in solution and how it may form pore. *PMC Biophysics* 3: 1–16.
- Singh Y, Chaudhary VK, Leppla SH (1989) A deleted variant of *Bacillus anthracis* protective antigen is non-toxic and blocks anthrax toxin action *in vivo*. *J Biol Chem* 264: 19103–19107.
- Sharma A, Nain V, Lakhanpaul S, Kumar PA (2010) Synergistic activity between *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and Cry1Ac toxins against maize stem borer (*Chilo partellus* Swinhoe). *Lett Appl Microbiol* 51: 42–47.
- Lee MK, Curtiss A, Alcantara E, Dean DH (1996) Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAC on the Gypsy moth *Lymantria dispar*. *Appl Environ Microbiol* 62: 583–586.
- Willrich Siebert M, Nolting S, Leonard BR, Braxton LB, All JN, et al. (2008) Efficacy of transgenic cotton expressing Cry1Ac and Cry1F insecticidal protoxin against heliothines (Lepidoptera Noctuidae). *J Econ Entomol* 101: 1950–1959.
- Chang C, Yu YM, Dai SM, Law SK, Gill SS (1993) High-level *cryIVD* and *cryIA* gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Appl Environ Microbiol* 59: 815–821.
- Delecluse A, Poncet S, Klier A, Rapoport G (1993) Expression of *cryIVA* and *cryIVB* genes independently or in combination in a crystal negative strain of *Bacillus thuringiensis* subs *israelensis*. *Appl Environ Microbiol* 59: 3922–3927.



34. Arantes O, Lereclus D (1991) Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* 108: 115–119.
35. Muñoz-Garay C, Sánchez J, Darszon A, de Maagd RA, Bakker P, et al. (2006) Permeability changes of *Manduca sexta* midgut brush border membranes induced by oligomeric structures of different Cry toxins. *J Membr Biol* 212: 61–68.
36. Höfte H, Grave H, Seurinck J, Jansens S, Mahillon J, et al. (1986) Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* berliner 1715. *Eur J Biochem* 161: 273–280.
37. Thomas WE, Ellar DJ (1983) *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Sci* 60: 181–197.