



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

**“ANÁLISIS MOLECULAR DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE
TOXINAS Cyt ACTIVAS CONTRA MOSQUITOS”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

LIC. JAZMIN ALAIDE LÓPEZ DÍAZ

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. MARÍA ALEJANDRA BRAVO DE LA PARRA (IBT-UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. MARTHA VERÓNICA VAZQUEZ LASLOP (IBT, UNAM)

DR. HUMBERTO LANZ MENDOZA (CISEI, INSP)

CUERNAVACA, MORELOS, OCTUBRE 2013



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.

AGRADECIMIENTOS

A mi esposo Zeferino, por estar siempre a mi lado apoyándome y brindarme su tiempo cada vez que yo quería discutir algún tema de mi proyecto. Te amo Zefe.

A mis padres Ángel y Elvia por su infinito apoyo y ejemplo para seguir superándome.

A mis hermanas Itzel y Nguyen porque muchas veces hicieron que mis días de estrés se volvieran más agradables. También gracias a mis queridos cuñados Carlos y Miky por las bromas que siempre nos hemos jugado. Y que decir mis hermosas sobrinas que tanto quiero: Meghan y Ximena, ellas llenan mi vida de alegría.

¡Gracias Familia!

A los queridos doctores Alejandra y Mario porque me abrieron las puertas de su laboratorio y me apoyaron a lo largo de toda mi estancia para concluir la Maestría; por sus consejos académicos, gracias.

A la gente del grupo Bravo-Soberón: Isabel, Carlos, Leivi, Diana, Violeta, Emiliano, Biviana, Meztli, Josué, Fernando, Daniela, compañeros con los que pasé tiempos increíbles. Leivi, Dianita y Bivi se han convertido en buenas amigas. Gracias por sus consejos, regaños y por motivarme cada vez que dudaba de mis capacidades. Gracias por su amistad.

Y no podían faltar mis agradecimientos especiales a los compañeros que con su apoyo técnico y administrativo nos ayudan en el trabajo diario:

Graciela Domínguez Pineda, gracias por tantas molestias para conseguir nuestros reactivos. Técnico Académico Jorge Félix Sánchez Quintana, gracias por todo el apoyo técnico para enseñarme los protocolos básicos para trabajar en el

laboratorio. Sergio Blancas Naranjo, gracias porque siempre estuvo dispuesto a prepararme mis medios, geles y reactivos, aún fuera de su turno laboral. María Xochitl González Candelario, gracias por tantos buenos ratos que pasamos, por tantos consejos y por ser tan eficiente en tu trabajo.

En mi estancia en este laboratorio hice buenos amigos, pero en particular agradezco el apoyo me brindó la Dra. Isabel Gómez; gracias por todo tu apoyo profesional, pero en particular gracias por tu amistad.

A mis muy queridos amigos del IBt, Paty y César, gracias por seguir siendo siempre tan honestos y brindarme siempre sus consejos. Gracias por escucharme y alentarme a seguir siempre adelante, gracias por esas inolvidables “tardes de café”. Los quiero mucho.

Agradecimiento al proyecto: DGAPA-UNAM IN201113

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ABREVIATURAS

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Toxinas Cry de 3-dominios	4
1.1.1 Estructura de las toxinas Cry de 3-dominios	4
1.1.2 Mecanismo de acción de las toxinas Cry de 3-dominios	5
1.1.3 Receptores celulares de toxinas Cry de 3-dominios	6
1.2 Toxinas de la familia Cyt	6
1.2.1 Estructura de las toxinas Cyt	7
1.2.2 Mecanismo de acción de las toxinas Cyt	8
1.2.2.a) Mecanismo de formación de poro	9
1.2.2.b) Mecanismo de molécula detergente	10
1.2.3 Sinergismo entre toxinas Cyt y toxinas Cry	11
1.2.4 Otros usos biotecnológicos de las toxinas Cyt	14
2. ANTECEDENTES	16
2.1 Alineamiento de la toxina Cyt1Aa con otras toxinas Cyt relacionadas	16
2.2 Dominios funcionales de Cyt1Aa	18
2.3 Péptidos sintéticos relacionados con la interacción y agregación de la toxina Cyt1Aa en membranas sintéticas.	19
2.4 Mutantes en las hélices α -A y α -C de la toxina Cyt2Aa	19

3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1 Mutación sitio-dirigida	22
5.2 Reacción de PCR mutagénico	25
5.3 Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i>	26
5.4 Transformación de células de <i>E. coli</i>	27
5.5 Preparación de células electrocompetentes de <i>B. thuringiensis</i>	28
5.6 Transformación de células electrocompetentes de <i>B. thuringiensis</i>	29
5.7 PCR de colonia	30
5.8 Producción de cristales de las toxinas mutantes de Cyt1Aa (Cyt1Aa*)	31
5.9 Purificación de espora-cristal de las toxinas Cyt1Aa*	32
5.10 Análisis de la estabilidad de las toxinas Cyt1Aa*	33
5.11 Activación de las toxinas Cyt1Aa y Cyt1Aa*	33
5.12 Preparación de liposomas con lípidos sintéticos de fosfatidilcolina, estearilamina y colesterol	34
5.13 Ensayos de oligomerización de las toxinas Cyt1Aa y Cyt1Aa*	34
5.14 Western-Blot	36
5.15 Ensayo de hemólisis	36
5.16 Bioensayos con mosquitos	38
5.17 Análisis del sinergismo entre las toxinas Cyt1Aa* y la toxina Cry11Aa silvestre	38

6. RESULTADOS	42
6.1 Obtención de toxinas mutantes en las hélices α -A y α -C de Cyt1Aa	42
6.2 Obtención de espora-cristal de cada toxinas Cyt1Aa*	42
6.3 Solubilización de las toxinas Cyt1Aa*	43
6.4 Activación de la toxina Cyt1Aa silvestre	45
6.5 Activación de las toxinas Cyt1Aa*	46
6.6 Ensayos de oligomerización	47
6.7 Ensayos de hemólisis en sangre de conejo	51
6.8 Bioensayos con larvas de cuarto instar de <i>Aedes aegypti</i>	52
6.9 Evaluación del Sinergismo de las toxinas Cyt1Aa o Cyt1Aa* con la toxina Cry11Aa	53
7. DISCUSIÓN	58
8. CONCLUSIONES	68
9. REFERENCIAS	69
10. ANEXOS	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura tridimensional de la toxina Cry1Aa de 3-dominios	5
Figura 2. Representación de la estructura del monómero de Cyt1Aa	7
Figura 3. Mecanismo de acción de las toxinas Cyt.....	9
Figura 4. Modelo de formación de poro	10
Figura 5. Modelo de detergente	10
Figura 6. Alineamientos estructurales entre la toxina Cyt1Aa y otras proteínas relacionadas a Cyt	17
Figura 7. Representación de los residuos que conforman a las hélices α -A y α -C de la toxina Cyt1Aa y de la hélice α -C de VVA2.....	23
Figura 8. Análisis de los cristales (Sp-C) y de la solubilización de la toxina Cyt1Aa y las toxinas Cyt1Aa*.....	44
Figura 9. Activación de la toxina Cyt1Aa usando Proteinasa K y Tripsina	46
Figura 10. Procesamiento de las toxinas Cyt1Aa* usando Proteinasa K y Tripsina	47
Figura 11. Análisis de la oligomerización de la toxina Cyt1Aa y las toxinas Cyt1Aa* en presencia de liposomas (SU).....	50
Figura 12. Análisis de la hemólisis de eritrocitos de conejo.....	51
Figura 13. Bioensayo de sinergismo entre las toxinas Cyt1Aa o Cyt1Aa* y la toxina Cry11Aa	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Actividad insecticida de toxinas de la familia Cyt	3
Tabla 2: Concentración letal 50 (LC ₅₀) de las toxinas producidas por <i>B. thuringiensis israelensis</i>	12
Tabla 3: Diseño de oligonucleótidos para generar los genes de las toxinas mutantes de Cyt1Aa	24
Tabla 4: Reactivos usados para cada una de las reacciones de PCR mutagénico	25
Tabla 5: Reactivos usados para cada reacción de PCR de colonia	31
Tabla 6: Reactivos y condiciones usados durante la reacción de oligomerización, usando proteinasa K y tripsina	35
Tabla 7. Concentraciones usadas en el bioensayo de sinergismo cualitativo	41
Tabla 8. Obtención de la LC ₅₀ de la toxina Cyt1Aa y las toxinas Cyt1Aa*	53
Tabla 9. Sinergismo entre las toxinas Cyt1Aa o Cyt1Aa* y la toxina Cry11A contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> de 4to instar	57

ABREVIATURAS

Amp: Ampicilina
ALP: Fosfatasa alcalina
APN: Aminopeptidasa tipo N
BBMV's: Vesículas de la microvellosidad apical (por sus siglas en inglés)
BSA: Albúmina de Suero Bovino (por sus siglas en inglés)
CADR: Proteínas tipo Caderinas
DE₅₀: Dosis efectiva media
D.O: Densidad óptica
DTT: Ditioneitol
Erm: Eritromicina
LC₅₀: Concentración letal media
Medio LB: Lysogenic Broth
Medio SP: Medio de esporulación
PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
Sp-C: Espora cristal
SUV: Vesículas Unilamelares pequeñas (por sus siglas en inglés)
TFPs: Toxinas Formadoras de Poro
T.N: Toda la noche

RESUMEN

La bacteria *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* es una bacteria Gram positiva, que produce un cuerpo paraesporal compuesto por dos toxinas de la familia Cyt (Cyt1Aa y Cyt2Ba) y cuatro toxinas de la familia Cry de 3-Dominios (Cry11Aa, Cry4Aa, Cry4Ba y Cry10A), las cuales son potenciadas (sinergizadas) por Cyt1Aa. La toxina Cyt1Aa es una de la más estudiadas por su importancia para combatir al mosquito *Aedes aegypti* transmisor del Dengue en todo el mundo, y debido a que no se han reportado poblaciones de mosquitos resistentes a esta toxina.

Se ha propuesto que la toxina Cyt1Aa forma oligómeros en presencia de membranas y que podrían ser los responsables de la actividad insecticida y hemolítica de dicha toxina, también se propone, que la toxina Cyt1Aa debe oligomerizar para sinergizar la actividad de las toxinas Cry.

En este trabajo se realizaron mutantes de la toxina Cyt1Aa que perdieron la capacidad de formar oligómeros y se usaron para evaluar la actividad insecticida contra larvas de *A. aegypti*, la actividad hemolítica contra eritrocitos de conejo y de sinergismo con la toxina Cry11Aa contra larvas de *A. aegypti*.

Al analizar las mutantes, se encontró que los residuos V122 y V126 resultaron ser esenciales en la oligomerización de la toxina, ya que al mutarlos por aminoácidos con carga, perdieron la capacidad de formar oligómeros. Se demostró que cuando las mutantes V122E y V126E se incuban con liposomas sintéticos, no formaron oligómeros, además, perdieron por completo la actividad insecticida contra larvas de *A. aegypti*. También se observó que estas mutantes se ven afectadas en la actividad hemolítica, sin embargo, se observó que las mutantes de Cyt1Aa mantienen su capacidad de hacer sinergismo con la toxina Cry11Aa, es decir, logran aumentar la actividad insecticida, cuando se analizaron contra larvas de *A. aegypti*.

Debido a los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que la toxina Cyt1Aa tiene actividad hemolítica e insecticida que dependen de su capacidad de formar oligómeros. La actividad de sinergismo, por otro lado, parece no depender de la formación de dicho oligómero, ya que toxinas mutantes que no forman oligómero y no tienen actividad insecticida (V122E y V126E) son capaces de sinergizar la actividad de la toxina Cry11Aa para matar larvas de *A.aegypti*. Finalmente, se determinó que la toxina Cyt1Aa se inserta en las membranas sintéticas en forma de oligómero y no como monómeros.

1. INTRODUCCIÓN

Año con año se incrementa la población humana mundial y con ello se incrementa entre otras cosas, la demanda de alimento. El mejoramiento en la agricultura para producir mayores cantidades de alimentos es una necesidad constante y hacer uso de las tecnologías para tener mayor cantidad y mejores cultivos es una prioridad. Además, se ha reportado que las pérdidas a causa del ataque de insectos plaga es muy elevada y representan entre el 20-30 % de las pérdidas de producción. Por lo tanto, el uso de nuevas alternativas para combatir las plagas propias de cada tipo de cultivo, sin dañar el medio ambiente, es un tema de interés para incrementar la producción agrícola. Aunado a las plagas relacionadas con la agricultura, en los últimos 20 años se han visto incrementadas las poblaciones de insectos relacionadas con la transmisión de enfermedades y que cada año causan la muerte a millones de personas alrededor del mundo. Algunas de estas plagas son vectores de enfermedades de interés en salud pública; por ejemplo, los mosquitos que transmiten el dengue, la malaria, la fiebre amarilla y la encefalitis, los cuales causan más de 100 millones de casos anuales en todo el mundo.

Debido a la necesidad de combatir a los insectos plaga y en un esfuerzo por no seguir dañando el medio ambiente con el uso indiscriminado de insecticidas químicos altamente tóxicos para todo tipo de vida, muchos grupos de investigación en todo el mundo han dedicado grandes esfuerzos para encontrar alternativas más limpias y compatibles con el medio ambiente, efectivas y económicas que permitan controlar dichas plagas.

Una de las mejores alternativas para resolver este problema es sin duda el uso de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*). *B. thuringiensis* es una bacteria entomopatógena, Gram positiva, que durante su ciclo de vida presenta dos fases: vegetativa y de esporulación. Durante la fase vegetativa, las bacterias se duplican por bipartición entre cada treinta a noventa minutos. En la fase de esporulación, se lleva a cabo un proceso de diferenciación de bacteria a espora, una

condición presente cuando la bacteria crece bajo limitación de nutrientes. Durante la fase de esporulación, *B. thuringiensis* produce inclusiones paraesporales de carácter proteico con actividad insecticida específica hacia diferentes insectos blanco. Estas inclusiones paraesporales están formadas por proteínas clasificadas como δ -endotoxinas, y han sido clasificadas con base en la identidad de secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, se ha establecido que las toxinas que produce *B. thuringiensis* pertenecen a dos familias completamente diferentes: la familia de toxinas Cry (Cristal) y la familia de toxinas Cyt (Citolítica).

Las toxinas Cry y las toxinas Cyt pertenecen a una clase general de toxinas bacterianas conocidas como toxinas formadoras de poro (TFPs). Este tipo de toxinas son secretadas como proteínas que son solubles en ambientes acuosos y después de presentar algunos cambios conformacionales, se insertan en la membrana de las células del intestino de sus hospederos haciendo poros, lo que afecta el balance osmótico de las células, causando la lisis celular y finalmente, provocando que el organismo blanco muera (Parker y Feil, 2005).

Las toxinas de la familia Cry resultan ser tóxicas contra diferentes órdenes de insectos: *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Acari* y otros invertebrados que incluyen los órdenes *Nemathelminthes*, *Plathelminthes* y *Sarcomastigophora* (Bravo *et al.*, 1997). En contraste, las toxinas de la familia Cyt muestran preferencia por matar insectos del orden *Diptera* (Tabla 1), aunque existen reportes de que algunas toxinas Cyt pueden matar larvas de insectos del orden *Coleoptera*. Por ejemplo, la toxina Cyt1Aa que es tóxica para larvas de *Chrysomela scripta* (Federici y Bauer, 1998) y la toxina Cyt2Ca que mata larvas de *Leptinotarsa decemlineata* y *Diabrotica spp* (Rupar *et al.*, 2000). La Tabla 1 muestra los insectos blanco que son susceptibles a diferentes toxinas Cyt producidas por *B. thuringiensis*.

Una subespecie de *B. thuringiensis*, la bacteria *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* (*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*) es una alternativa efectiva para combatir insectos del orden *Diptera*, principalmente mosquitos y mosca negra.

El cristal que produce *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* está compuesto por cuatro toxinas de la familia Cry (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa y Cry11Aa) y dos toxinas de la familia Cyt (Cyt1Aa y Cyt2Ba); cada una por separado tienen baja actividad insecticida, pero juntas su toxicidad se sinergiza (potencia) generando una combinación de toxinas muy efectiva (Tabla 2), que aún después de 30 años de uso en campo de manera exhaustiva, no se ha reportado la generación de insectos resistentes a esta mezcla de toxinas.

Tabla1: Actividad insecticida de toxinas de la familia Cyt

Orden	Género	Especie	Cyt1Aa	Cyt1Ab	Cyt1Ba	Cyt2Aa	Cyt2Ba	Cyt2Bc	Cyt2Ca
Diptera	<i>Aedes</i>	<i>aegypti</i>	●	●		●	●	●	
Diptera	<i>Anopheles</i>	<i>stephensi</i>	●	●			●	●	
Diptera	<i>Anopheles</i>	<i>gambiae</i>	●			●			
Diptera	<i>Culex</i>	<i>pipiens</i>	●	●		●	●	●	
Diptera	<i>Culex</i>	<i>quinquefasciatus</i>	●			●	●	●	
Diptera	<i>Chironomus</i>	<i>tepperi</i>	●						
Diptera	<i>Tipula</i>	<i>paludosa</i>	●						
Diptera	<i>Lucilia</i>	<i>cuprina</i>	●			○			
Diptera	<i>Lucilia</i>	<i>sericata</i>	●			○			
Diptera	<i>Calliphora</i>	<i>stygia</i>	●			○			
Diptera	<i>Liriomyza</i>	<i>trifoli</i>			●				
Coleoptera	<i>Chrysomela</i>	<i>scripta</i>	●						
Coleoptera	<i>Leptinotarsa</i>	<i>decemlineata</i>							●
Coleoptera	<i>Diabrotica</i>	<i>spp</i>							●

● Alta actividad insecticida ○ Baja actividad insecticida

Tabla tomada de la página Natural Resources Canada

(http://www.glf.c.forestry.ca/bacillus/dip_sum.cfm?lang=eng)

1.1 Toxinas Cry de 3-dominios

Esta familia de toxinas cuenta con al menos 50 subgrupos y más de 200 miembros. Las toxinas Cry se definen como: proteínas de inclusión “parasporal” producidas por *B. thuringiensis* que tienen un efecto tóxico hacia un organismo blanco, también son definidas como cualquier proteína que tiene similitud de secuencia con las proteínas Cry (Crickmore *et al.*, 1998).

Las toxinas Cry son miembros de una familia llamada proteínas globulares de 3-dominios, debido a que contienen 3-dominios estructurales.

1.1.1 Estructura de toxinas Cry de 3-dominios

Se cuenta con la cristalografía de 6 diferentes toxinas Cry: Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4Aa y Cry4Ba. Todas estas proteínas presentan un alto grado de similitud estructural entre sí, y constan de tres dominios estructurales con una topología semejante (Figura 1).

Dominio I: Este se localiza en la región N-terminal de la proteína. Está formado por siete α -hélices, donde la hélice central (hélice- α 5), es hidrofóbica y está rodeada por 6 α -hélices anfipáticas. Este dominio, es el responsable de la inserción de la toxina a la membrana y la formación del poro. Además, el dominio I, comparte similitud estructural con otras toxinas formadoras de poro (TFP), como colicina Ia y la tipo N, y la toxina de la difteria; apoyando el papel de este dominio en la formación de poro.

Dominio II: Está constituido por tres hojas β antiparalelas que comparten una topología similar a la conformación de una llave griega y por tres asas. Este dominio se ha asociado con el proceso de reconocimiento y de unión al receptor en las microvellosidades del epitelio intestinal, y más recientemente, a la formación de la estructura oligomérica pre-poro. Específicamente las asas (“loops” en inglés) en la parte inferior están involucradas en interacciones con diferentes proteínas que

funcionan como receptores. Hay muchos casos de proteínas que comparten similitud estructural con el dominio II de las toxinas Cry, se han descrito proteínas de unión a carbohidratos como: vitelina, lectina jacalina y lectina Mpa (de Maagd *et al.*, 2003).

Dominio III: Es un β -sándwich de dos hojas antiparalelas. Este dominio también se involucra con la unión a receptores en los insectos blanco, específicamente las hebras β -16 y β -22 participan en esta interacción. Este dominio comparte similitud estructural con otras proteínas de unión a carbohidratos como: el dominio de unión a celulosa de la 1,4- β -glucanasa C, galactosa oxidasa, sialidasa, β -glucoronidasa, el dominio de unión a carbohidratos de la xilanasa U y β -galactosidasa (de Maagd *et al.*, 2003).

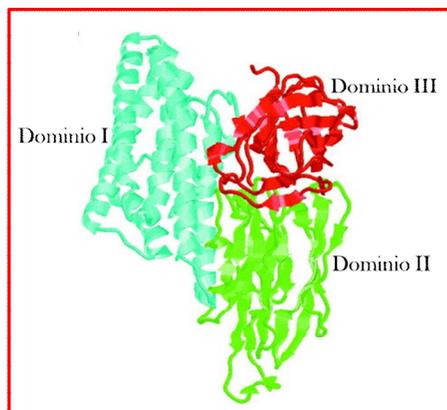


Figura 1. Estructura tridimensional de la toxina Cry1Aa de 3-dominios. El dominio I está involucrado en la inserción de la toxina a la membrana y en la formación de poro. Dominios II y III, involucrados en el reconocimiento y unión a receptores en el intestino del insecto susceptible.

1.1.2 Mecanismo de acción de las toxinas Cry de 3-dominios

El modo de acción de la toxina Cry se ha caracterizado principalmente en Lepidópteros. Las toxinas Cry se producen como protoxinas formando un cristal paraesporal durante la esporulación de *B. thuringiensis*. Cuando los cristales son ingeridos por una larva susceptible, estos se solubilizan en el lumen intestinal debido al pH alcalino del intestino del insecto. La protoxina soluble se procesa por acción de las proteasa que están presentes en el intestino del insecto, en los extremos amino terminal (N-terminal) y carboxilo terminal (C-terminal) de la proteína y se libera una

toxina activa de entre 60 y 70 kilodaltones (kDa). Una vez activadas las toxinas Cry, se unen a receptores específicos en las membranas de las células del epitelio del intestino, lo que les permite insertarse en la bicapa lipídica para formar un poro que lisis la célula. La lisis celular provoca que se liberen iones, agua y demás contenido celular, lo que genera que el intestino del insecto blanco sea apto para que germinen las esporas de *B. thuringiensis* o crezcan otros microorganismos, lo que provoca una septicemia en el insecto.

1.1.3 Receptores celulares de la toxina Cry1A

Se han descrito al menos cuatro proteínas que funcionan como posibles receptores de Cry1A en Lepidópteros:

- Proteínas tipo caderina (CADR)
- Una Aminopeptidasa tipo N (APN) anclada por glucosilfosfatidil inositol (GPI)
- Una fosfatasa alcalina (APL) anclada por GPI
- Un glucoconjugado de 270 kDa

1.2 Toxinas de la familia Cyt

Las toxinas de la familia Cyt, reciben su nombre debido a la actividad citolítica que poseen *in vitro* contra una amplia gama de líneas celulares provenientes de distintos tejidos de insectos como: *Aedes albopictus*, *Choristoneura fumiferana*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*. Las toxinas Cyt también son activas hacia algunas líneas celulares de mamíferos provenientes de fibroblastos de ratón, linfocitos de cerdo y contra tres diferentes tipos de carcinomas epiteliales de ratón. Además, la toxina solubilizada en condiciones alcalinas es toxica contra eritrocitos de ratas, ratones, conejos, ovejas, caballos y de humano, por lo que también se les conoce como toxinas hemolíticas (Thomas y Ellar, 1983a).

La familias de las toxinas Cyt se divide en tres grupos: Cyt1, Cyt2 y Cyt3. Ya se tienen reportes de estructuras cristalográficas de algunas de ellas.

1.2.1 Estructura de las toxinas Cyt

Actualmente se encuentra resuelta la estructura cristalográfica de tres toxinas de la familia Cyt: **Cyt2Aa** (Li *et al.*, 1996), **Cyt2Ba** (Cohen *et al.*, 2008) y **Cyt1Aa** (Cohen *et al.*, 2011). Las estructuras muestran que las toxinas Cyt comparten una topología similar entre ellas, que es semejante a la de una citolisina. Esta topología se relaciona con la habilidad de las toxinas de hacer cambios conformacionales previo a la inserción en membrana. Las toxinas de la familia Cyt presentan un solo dominio estructural del tipo α - β , formado por un ramillete de siete hebras β (que se numeran del 1-7), rodeadas por dos capas de α -hélices (nombradas hélices A-B y C-D) de carácter anfipáticas (Figura 2).

El reporte de la estructura cristalográfica de la toxina Cyt1Aa muestra que esta toxina contiene una inserción de tipo horquilla (“ β -hairpin” en inglés) compuesta por las hebras β 2- β 3 ubicada entre la hélice α -A y la hélice α -B. Esta estructura tipo horquilla es común entre todas las toxinas del grupo Cyt1, mientras que está ausente en las toxinas del grupo de toxinas Cyt2.

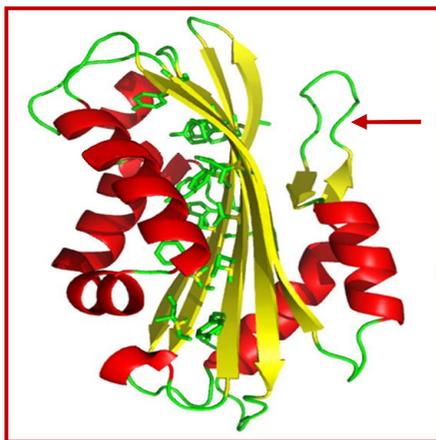


Figura 2. Representación de la estructura del monómero de Cyt1Aa. Las toxinas de la familia Cyt presentan un solo dominio estructural tipo α - β que se compone de un ramillete de siete hebras- β (que se numeran del 1-7), rodeadas por dos capas de α -hélices (nombradas hélices A-B y C-D) de carácter anfipáticas. La flecha indica una estructura de “ β -hairpin” presente sólo en las toxinas de la familia Cyt1. Figura tomada de Cohen *et al.*, 2011.

1.2.2 Mecanismo de acción de las toxinas Cyt

Las toxinas Cyt son proteínas que se sintetizan dentro la fase de esporulación de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* como protoxinas y se agregan formando un cristal paraesporal en un compartimento de la célula madre de *B. thuringiensis* subsp. *Israelensis* (Anexo 1). Los cristales de Cyt son ingeridos por la larva y dentro del intestino del insecto blanco se solubiliza la protoxina por el pH alcalino (pH 10.5) presente en el intestino del insecto (Figura 3). Las toxinas del tipo Cyt1 se solubilizan en forma de monómero (Cohen *et al.*, 2011), en cambio, las toxinas Cyt2 al solubilizarse forman un dímero (Li *et al.*, 1996).

A la protoxina soluble le ocurren pequeños cortes proteolíticos en el extremo N-terminal y también en el extremo C-terminal, generando un fragmento resistente a proteasas que se conoce como toxina Cyt activada (Figura 3). Cada toxina Cyt es procesada de diferente forma y los cortes los hacen las proteasas presentes en el intestino del insecto. Cuando se activa la toxina Cyt1Aa, se remueven 31 aminoácidos del N-terminal y 24 del C-terminal (Al-yahyaee y Ellar, 1995), en el caso de Cyt2Aa, se remueven 33-37 amino ácidos del N-terminal y 22-31 del C-terminal con un tratamiento de proteinasa K, lo que produce una proteína monomérica de entre 22 y 25 kDa (Li *et al.*, 1996). En cambio en la toxina Cyt2Ba se remueven 34 residuos de N-terminal y 28 ó 30 residuos del C-terminal (Cohen *et al.* 2008).

A diferencia de las proteínas Cry que interactúan con receptores proteínicos específicos en las membranas de las células de la microvellosidad del intestino del insecto blanco (Figura 3), las toxinas Cyt interactúan directamente con fosfolípidos insaturados de membranas de insectos dípteros, como: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomiélin (Thomas y Ellar, 1983b).

Aún no se ha podido elucidar exactamente el mecanismo molecular por el cual las toxinas Cyt matan a sus insectos blanco o lisa células como: eritrocitos, linfocitos o líneas celulares en cultivo. Sin embargo, se han descrito dos mecanismos de acción para la toxina

Cyt1Aa (Figuras 3 y 4). El primero llamado de formación de poro, que fue propuesto por el Dr. Thomas y el Dr. Ellar (1983). El segundo mecanismo, de actividad tipo detergente fue propuesto por el Dr. Peter Butko (2003). Ambos mecanismo se describirán en detalle más adelante.

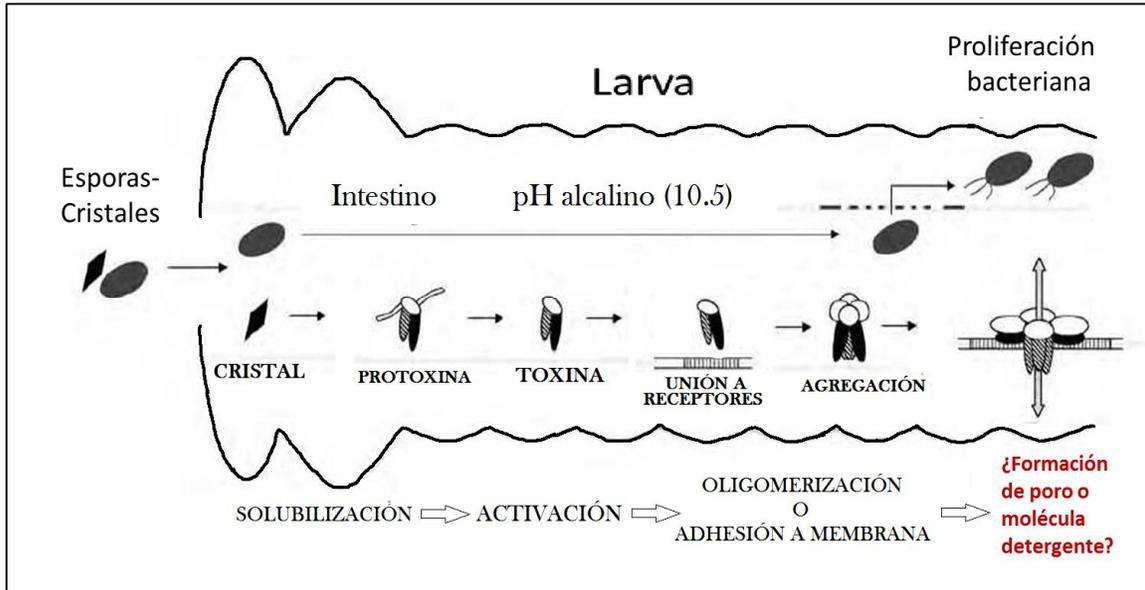


Figura 3. Mecanismo de acción de las toxinas Cyt. La larva ingiere los cristales y las esporas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* presentes en el ambiente. Dentro del intestino de la larva se solubiliza la protoxina debido al pH alcalino ahí presente, posteriormente las proteasas presentes en el intestino hacen una serie de cortes proteolíticos a la protoxina, lo que activa o genera una toxina funcional. Una vez que se ha activado a la toxina, ésta se une a la membrana a través de sus receptores: fosfolípidos insaturados (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomielina) presentes en las membranas de la microvellosidad intestinal. Finalmente, la toxina es capaz de ejercer su acción mediante alguno de los mecanismos propuestos para las toxinas Cyt: formación de poro o molécula detergente. Una vez que las toxinas Cyt han lisado a las células, las esporas pueden germinar porque se presenta un ambiente rico en nutrientes y proliferar las bacterias.

1.2.2.a) Mecanismo de formación de poro

Este modelo propone que las toxinas Cyt pueden formar poros o canales en la membrana plasmática, lo que provoca que entre agua a la célula y que salgan de ella algunos iones, ocasionando un desequilibrio osmótico y posteriormente la lisis celular. De acuerdo a esta hipótesis, las toxinas Cyt se unen irreversiblemente a fosfolípidos insaturados de la membrana celular (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y

esfingomielina) en un arreglo oligomérico, para formar un poro en células epiteliales en el intestino del mosquito (Li *et al.*, 1996).

El modelo de formación de poro propone que debido a que las α -hélices presentes en las toxinas Cyt son muy cortas para atravesar toda la membrana y formar el poro o canal, entonces son las hebras β -5, β -6 y β -7 las que se insertan en las membranas formando un barril tipo β y las hélices α permanecen en la superficie (Figura 4).

Este modelo ha sido validado mediante experimentos en bicapas lipídicas planas, donde se registraron canales con selectividad a cationes formados por estas toxinas y con ensayos donde se analizó la liberación de solutos marcados de vesículas, en presencia de la toxina (Knowles *et al.*, 1989).

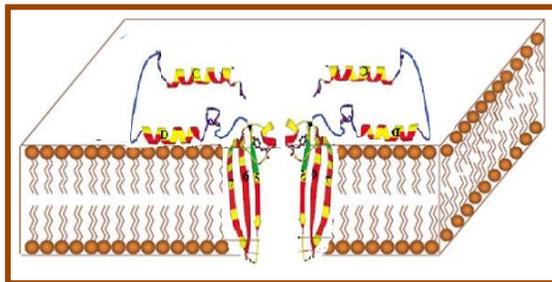


Figura 4. Modelo de formación de poro. En este modelo, para formar el poro o canal las hebras β -5, β -6 y β -7 de la toxina Cyt1Aa se insertan en las membranas celulares formando un barril tipo β y las hélices α permanecen en la superficie. Modificado de Promdonkoy *et al.*, 2010.

1.2.2.b) Mecanismo de molécula detergente

El segundo mecanismo propone que las toxinas Cyt se agregan de forma desestructurada y sin insertarse en la membrana, permitiendo que ésta se desensamble lo que provoca la lisis celular y por lo tanto el insecto blanco muere.

La hipótesis propuesta por este modelo es: las toxinas Cyt se adsorben en la superficie de la membrana, se agregan de manera poco específica en estructuras tipo “tapetes” que actúan como un detergente, causando que la membrana se rompa en complejos de lípidos-proteínas tipo micela de muchos tamaños (Manceva *et al.*, 2005), por

lo que las membranas celulares se desintegran completamente (Figura 5). Este modelo únicamente se ha validado en líneas celulares o usando liposomas sintéticos.

Cada modelo opera a diferente concentración o en diferente escala de tiempo. Mientras que a baja concentración de la toxina se pueden formar oligómeros que hacen poros, a alta concentración las moléculas se acomodan sobre la membrana interrumpiendo la estructura de bicapa lipídica, lo que la desestabiliza y finalmente la rompe. Por esta razón, ambos modelos no son mutuamente excluyentes (Butko, 2003), sin embargo, aún se mantiene en controversia cuál modelo resuelve el modo de acción de las toxinas de la familia Cyt *in vivo*.

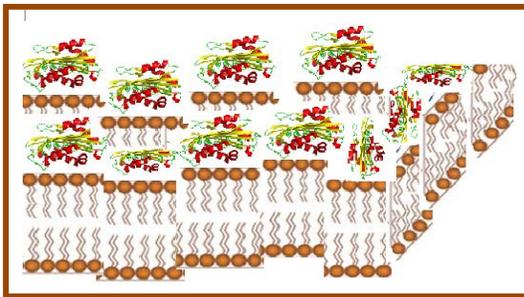


Figura 5. Modelo de detergente. En este modelo, las toxinas se adsorben en la superficie de la membrana donde se agregan de manera poco específica en estructuras tipo “tapetes” actuando como un detergente que desestabilizan la membrana y causan defectos en el empaquetamiento de los lípidos. Modificado de Promdonkoy *et al.*, 2010.

1.2.3 Sinergismo entre toxinas Cyt y toxinas Cry

Las toxinas que produce *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* han resultado ser sumamente eficaces en el control de *Aedes egypti* vector del Dengue y Fiebre amarilla y de especies de *Culex sp.* pero presenta moderada toxicidad contra *Anopheles gambiae* vector de la malaria. *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* produce cuatro toxinas de la familia Cry (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa y Cry11Aa) y dos toxinas de la familia Cyt (Cyt1Aa y Cyt2Ba). Se ha reportado que Cyt1Aa hace sinergismo con cada una de las toxinas Cry presentes en el cristal de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. De manera individual estas toxinas presentan baja actividad insecticida, sin embargo, su toxicidad se potencia al emplearse de manera conjunta (Tabla 2).

En nuestro laboratorio se propuso que el mecanismo de sinergismo entre Cyt1Aa y Cry11Aa depende de la interacción entre estas toxinas y se mapearon los residuos involucrados en esta interacción. Las regiones de interacción de Cyt1Aa son una asa que está entre la hebra β -6 y la α -hélice 5 y el otro sitio es parte de la hebra β -7. Las regiones de Cry11Aa están en el dominio II y son el asa α -8, el asa 2 y la hebra β -4 (Pérez *et al.*, 2005).

Interesantemente el asa α -8 y la hebra β -4 de Cry11Aa también están involucrados en la interacción con su receptor: la alcalino fosfatasa, molécula presente en las membranas de las microvellosidades de las células del intestino del insecto blanco.

La mutagénesis sitio dirigida de las regiones identificadas en Cry11Aa y en Cyt1Aa que afectaron la interacción entre ellas, afectaron el sinergismo, aunque individualmente algunas de las mutantes mantuvieran su toxicidad (Pérez *et al.*, 2005). Esto sugiere que la interacción entre Cyt1Aa y Cry11Aa es fundamental para inducir el sinergismo entre estas dos toxinas.

Además, se observó que la unión de Cry11Aa a Cyt1Aa facilita la formación de oligómeros de Cry11Aa, los cuales son capaces de hacer poros iónicos cuando se insertan en la membrana (Pérez *et al.*, 2007). Con base en estos datos, se propone que el sinergismo entre estas dos toxinas ocurre porque Cyt1Aa funciona como un receptor de Cry11Aa, permitiendo que el reconocimiento entre ellas promueva la oligomerización de la toxina Cry11Aa y su unión a membranas, para que se forme un poro capaz de lisar las células del insecto blanco.

Tabla 2. Concentración letal 50 (LC₅₀) de las toxinas producidas por *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*.

Toxina	LC ₅₀ (ng/ml)
Cyt1Aa	1209
Cry4A	1125
Cry4B	467
Cry11A	224
Bti Cristal	12
	10 ← Sinergismo

El sinergismo de Cyt1Aa con las toxinas Cry4Aa y Cry4Ba parece que se lleva a cabo por un mecanismo muy parecido al explicado anteriormente. Se demostró que algunas mutantes de la toxina Cyt1Aa afectadas en la unión a Cry11Aa, también están afectadas en la unión a la toxina Cry4Ba y la falta de unión entre ellas afecta el sinergismo, dato obtenido al ser probadas en bioensayos contra larvas de *Ae. aegypti*. También se mutagenizó el asa α -8 del dominio II de Cry4Ba y las mutantes resultantes estaban afectadas en la unión a Cyt1Aa y en el sinergismo hacia larvas de *Ae. aegypti* (Cantón *et al.*, 2011). Estos resultados sugieren que Cyt1Aa también funciona como un receptor para Cry4Ba, y explican el mecanismo de sinergismo entre las toxinas Cyt1Aa y Cry4Ba.

También es importante mencionar que Cyt1Aa no es tóxica para *Anopheles albimanus*, pero cuando se usa en combinación con Cry4Ba o con Cry11Aa, es capaz de sinergizar la actividad de estas dos toxinas Cry contra este mosquito incrementando su toxicidad varias veces (Fernandez-Luna *et al.*, 2010). Se sabe que la capacidad de oligomerización de las toxinas Cry es crucial para que se observe sinergismo. Lo anterior se demostró con una toxina mutante de Cry11Aa en la hélice α -3, la cual es incapaz de formar oligómeros y poros funcionales y por lo tanto, es incapaz de ser sinergizada por la toxina Cyt1Aa (Muñoz-Garay *et al.*, 2009). Así como con la toxina Cry11Aa, al probarse el sinergismo de la toxina Cyt1Aa con una toxina mutante de Cry4Ba en la hélice α -3 tampoco se observaron cambios en la actividad insecticida contra larvas de *Ae. aegypti*. Estos datos indican que la toxicidad de las toxinas Cry es importante para el efecto sinérgico con toxinas Cyt, sin embargo, en el caso contrario, la actividad insecticida de toxinas Cyt no es absolutamente necesaria para inducir sinergismo.

Además de potenciar la actividad de las toxinas Cry, Cyt1Aa es capaz de revertir la resistencia que algunos mosquitos han generado hacia las toxinas Cry. En estudios de laboratorio se han seleccionado poblaciones de *Culex quiquefasciatus* resistentes a Cry4Aa, Cry4Ba y Cry11Aa, así como a la mezcla de estas toxinas. Esta resistencia se revierte cuando esas poblaciones de mosquitos son tratadas con toxinas Cry en presencia de la toxina Cyt1Aa (Wirth *et al.*, 2005). También se ha reportado que no es posible aislar mosquitos resistentes a la toxina Cyt1Aa, ni se ha visto resistencia en campo de los

mosquitos cuando son tratados con las inclusiones cristalinas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* compuestas con toxinas de las familias Cry y Cyt, lo que apoya la propuesta de que la presencia de Cyt1Aa constituye una estrategia para inducir toxicidad de toxinas Cry y de esta manera se evita la selección de poblaciones resistentes a estas toxinas. Además, estos datos indican que el sinergismo por toxinas Cyt es una excelente estrategia para revertir la resistencia que presentan los mosquitos a toxinas Cry4Aa, Cry4Ba y Cry11Aa (Wirth *et al.*, 1997).

Bacillus sphaericus (*B. sphaericus*) es una bacteria no relacionada con *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* y tiene alta actividad contra mosquitos de las especies *Anopheles* y *Culex* y muy poco activa contra *Ae. aegypti*. Esta bacteria produce un cristal paraesporal compuesto de toxinas binarias: BinA y BinB, no relacionadas con las toxinas Cry; sin embargo, se demostró que la toxina Cyt1Aa de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* también sinergiza la actividad de las toxinas Bin contra larvas de *Ae. aegypti*. Una relación 10:1 *B. sphaericus*: Cyt1Aa fue 3600 veces más tóxica contra *Ae. Aegypti* que *B. sphaericus* sola (Wirth *et al.*, 2000). Estos datos indican que la toxina Cyt1Aa podría ayudar a aumentar el rango de acción de otras toxinas, como en el caso de *B. sphaericus*, aunque el mecanismo de sinergismo entre Cyt1Aa y las toxinas Bin aún no se ha estudiado.

1.2.4 Otros usos biotecnológicos de las toxinas Cyt

Además de usar las toxinas Cyt para el control de plagas, se ha propuesto que estas toxinas se pudieran ser útiles en aplicaciones médicas, como por ejemplo en el control de células cancerosas, ya que podrían emplearse como inmunotoxinas. Una inmunotoxina es una proteína o la subunidad de una toxina que se une químicamente o por ingeniería genética a un ligando que reconocen las células cancerígenas (generalmente anticuerpos monoclonales, hormonas, factores de crecimiento o péptidos).

Las inmunotoxinas se emplean en el tratamiento contra cáncer ya que pueden reconocer e interaccionar específicamente con receptores en células blanco cancerosas y ayudar a su eliminación, con la ventaja de que no dañan otras células del organismo

(Kreitman, 2006). Sin embargo, existen dos grandes problemas cuando se usan las inmunotoxinas: uno es la especificidad contra la célula blanco, es decir, que estas no sean tóxicas hacia otras células o que muestren baja toxicidad contra las células normales. El segundo problema es la baja eficiencia de las inmunotoxinas debido a la baja tasa de internalización, ya que estas moléculas deben cruzar la membrana y transportar el fragmento enzimático tóxico al citosol.

Se ha propuesto usar a las toxinas Cyt de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* como inmunotoxinas porque son toxinas formadoras de poro que matan células dañando la membrana plasmática celular sin necesidad de internalizarse en la célula blanco. La unión de Cyt1Aa al anticuerpo anti-Thy1 (que reconoce células cancerígenas) fue el primer intento. Sin embargo, resultó ser una quimera no funcional que podía unirse a la célula pero no la mataba, probablemente porque el anticuerpo es tan grande que evita que Cyt1Aa se inserte a la membrana y por lo tanto, no forma el poro lítico (Said *et al.*, 1996). Posteriormente se probó la unión de la toxina Cyt1Aa con moléculas más pequeñas: se usó la proteína insulina o un péptido de 13 residuos (una región de la mielina), estos desarrollos de inmunotoxina fueron tóxicos para células cancerosas blanco (Cohen *et al.*, 2007), sugiriendo que las toxinas Cyt podrían ser usadas como inmunotoxinas para tratar el cáncer.

Es de gran interés dilucidar el mecanismo por el cual las toxinas Cyt actúan, ya que tiene posible aplicación biomédica como inmunotoxinas. Por otra parte, las toxinas Cyt son de interés biotecnológico por su gran potencial para inducir sinergismo con otras toxinas Cry y por la capacidad para revertir resistencia a toxinas Cry en dípteros, además de que existe un mercado muy grande para usarlas como una alternativa dentro de la industria de los bioinsecticidas para combatir otras plagas de insectos.

2 ANTECEDENTES

2.1 Alineamiento de la toxina Cyt1Aa con otras toxinas Cyt relacionadas

Recientemente se publicó la estructura cristalográfica de la toxina Cyt1Aa (Cohen *et al.*, 2011) donde se reportó que adopta el plegamiento de una citolisina (Figura 2). Estas toxinas presentan un solo dominio estructural que es una lámina en el centro de la proteína formada por siete hebras β , rodeadas por dos capas de α -hélices. La secuencia de aminoácidos de Cyt1Aa, Cyt2Aa y Cyt2Ba se comparó con la secuencia de otras toxinas en el banco de datos NCBI (por sus siglas en inglés para Centro Nacional para la Información Biotecnológica) mediante un alineamiento PSI-BLAST (Figura 6) y en esta búsqueda se encontraron secuencias relacionadas de otros organismos patógenos, incluyendo bacterias y hongos, que presentan alguna similitud con la secuencia de toxinas Cyt de *B. thuringiensis*. Sin embargo, se sabe poco de la función de estos homólogos de Cyt.

De los resultados obtenidos en este alineamiento, algunos de los más interesantes son la presencia de toxinas relacionadas con Cyt en organismos eucariontes, específicamente de los hongos *Volvariella volvacea*, *Gibberella zeae* y *Schizophyllum commune*. El hongo *V. volvacea* produce la cardiotoxina volvatoxina 2 (VVA2). Esta cardiotoxina al igual que las toxinas Cyt es hemolítica y forma oligómeros cuando se incuba con liposomas de membranas, sin embargo, no tiene actividad insecticida (Weng *et al.*, 2004).

Otro grupo de toxinas que aparecen en este alineamiento son de bacterias simbióticas de nematodos patógenos de insectos. Entre estas bacterias se encuentra a *Erwinia carotovora* la cual produce el factor de virulencia *Erwinia* (Evf). También las bacterias *Xenorhabdus bovienii* y *Photorhabdus luminescens*, las cuales viven en el intestinos del nematodo entomopatógeno y cuando el nematodo infecta un insecto, la

bacteria se libera al torrente sanguíneo y rápidamente mata al insecto, ya que se producen varios factores de virulencia (Owuama, 2003; Duchaud *et al.*, 2003).

Existen reportadas las estructuras tridimensionales de VVA2 (Li *et al.*, 2004) y de Evf (Quevillon-Cheruel *et al.*, 2009) y muestran alta similitud en su estructura tridimensional con la toxina Cyt1Aa (Figura 6).

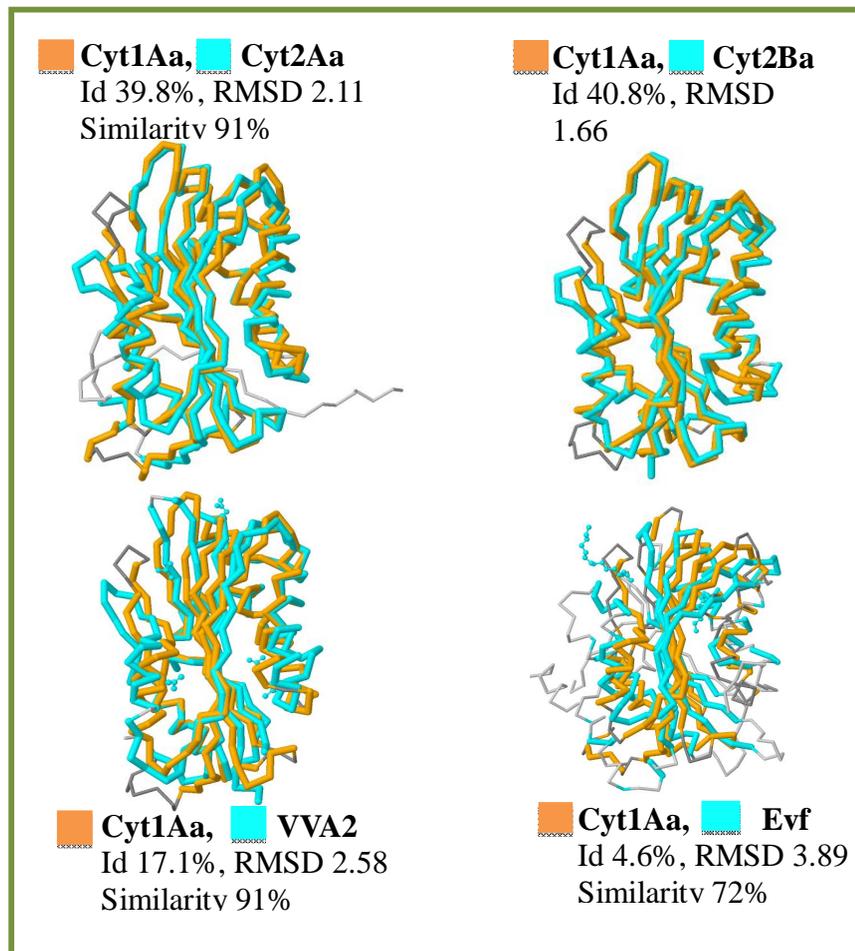


Figura 6. Alineamientos estructurales entre la toxina Cyt1Aa y otras proteínas relacionadas a Cyt. El alineamiento se hizo usando las estructuras cristalográficas de la toxina Cyt1Aa sobrepuesta con las toxinas Cyt2Aa, Cyt2Ba, VVA2 y Evf usando el algoritmo FACTCAT y dinámica computacional. Cyt1Aa, pdb 3RON; Cyt2Aa, pdb 1CBY; Cyt2Ba, pdb 2RCI; VVA2, pdb 1PPO; Evf, pdb 2W3Y.

La VVA2 presenta una topología muy similar a las toxinas Cyt, con cuatro α -hélices que rodean una lámina formada por hebras- β (Figura 6). Se demostró que VVA2 tiene dos dominios funcionales: el N-terminal y el C-terminal (Weng *et al.*, 2004). Estructuralmente el N-terminal tiene las cuatro α -hélices (A-D) y es el dominio encargado de la oligomerización de la toxina; el dominio C-terminal, contiene las hebras- β y es el encargado de reconocer el sitio de unión y la posterior inserción de la toxina en la membrana para formación de poro. Haciendo mutagénesis sitio dirigida en la cara hidrofóbica de la α -hélice C del dominio N terminal de la VVA2, se demostró que esta hélice es una región involucrada en la oligomerización de esta toxina y que es indispensable para la actividad hemolítica de la toxina (Weng *et al.*, 2004).

2.2 Dominios funcionales de Cyt1Aa

En nuestro laboratorio se clonaron los dominios N y C terminal de Cyt1Aa por separado y se demostró que presentan las mismas características que los dominios N y C terminal de la VV2 (Rodríguez-Almazán *et al.*, 2011). El dominio N-terminal de Cyt1Aa rico en α -hélices induce la oligomerización en solución, de la toxina Cyt1Aa completa. Estos oligómeros fueron similares en tamaño a los que forma Cyt1Aa en presencia de lípidos. También se determinó que la región N-terminal, inhibe la actividad hemolítica e insecticida contra larvas de *Ae. aegypti* de una manera dominante negativa, ya que se requieren concentraciones muy bajas de dominio N terminal para inhibir la toxicidad hacia larvas de mosquito o la hemólisis en células rojas de conejo. Sin embargo, no se identificó cuál es la región en el dominio N-terminal responsable de inducir la oligomerización de la toxina Cyt1Aa (Rodríguez-Almazán *et al.*, 2011).

Por otro lado, se demostró que el fragmento C-terminal de Cyt1Aa, compuesto por las hebras β -6 a la β -8, se une a la membrana de liposomas sintéticos y compite por la interacción con la membrana con toxina Cyt1Aa marcada. Esta interacción del fragmento C terminal con liposomas puede ser bloqueada por el anticuerpo monoclonal ati-10B9, que anteriormente se había visto que también inhibe la inserción de Cyt1Aa en la membrana de células de *Choristoneura fumiferana* (CF1), sugiriendo que el fragmento C terminal de la

toxina Cyt1Aa interacciona con la membrana de manera similar que la toxina Cyt1Aa completa (Rodríguez-Almazán *et al.*, 2011).

2.3 Péptidos sintéticos relacionados con la interacción y agregación de la toxina Cyt1Aa en membranas sintéticas.

Shai y colaboradores en 1997 reportaron que los péptidos sintéticos correspondientes a las hélices α -A y α -C del dominio N terminal en la toxina Cyt1Aa son capaces de interactuar directamente con liposomas sintéticos y que promueven la agregación de la toxina Cyt1Aa y la consecuente formación de oligómeros en esas membranas sintéticas. En ese reporte se hicieron una serie de péptidos sintéticos correspondientes a diferentes estructuras secundarias de la toxina Cyt1Aa: las hélices α -A, α -B, α -C y α -D y tres hebras- β , β -5, β -6 y β -7, además de usar un péptido no relacionado con la toxina Cyt1Aa, cecropina B2. Se usaron los diferentes péptidos sintéticos para competir la unión de la toxina Cyt1Aa marcada con el fluoróforo carboxifluorosceína (CytAa-Flu) preincubada con membranas sintéticas. De este análisis se concluyó que sólo las hélices α -A y α -C provocaron un aumento en la fluorescencia, lo que demostró que estas regiones de la toxina Cyt1Aa favorecen la interacción de la toxina con la membrana al inducir oligomerización de la toxina (Gazit *et al.*, 1997).

2.4 Mutantes en las hélices α -A y α -C de la toxina Cyt2Aa

En la estructura del monómero de la toxina Cyt2Aa, las hélices α -A, α -B, α -C y α -D son anfipáticas con los residuos hidrofóbicos empaquetados en contra de las hebras β (Li *et al.*, 1996). Estudios de mutagénesis sitio dirigida realizados en la toxina Cyt2Aa sugieren que la región comprendida entre las hélices α -A y α -D podrían estar involucradas en la oligomerización de la toxina (Promdonkoy y Ellar, 2003). Además de estos trabajos, Promdonkoy y colaboradores 2008 mutagenizaron específicamente las regiones de las hélices α -A y α -C de la toxina Cyt2Aa y obtuvieron mutantes que perdieron tanto la capacidad de formar el oligómero como la actividad hemolítica. Es sorprendente que la

mutante A61C (en la hélice α -A), aunque no forma oligómero y no tiene actividad hemolítica, sí mantiene la actividad insecticida hacia el mosquito *Aedes aegypti*. En cambio la mutante S108A (en la hélice α -C), pierde tanto la capacidad de formar oligómero, como su actividad hemolítica y su toxicidad contra mosquitos de *Aedes aegypti* y *Culex sp* (Promdonkoy *et al.*, 2008).

Sin embargo, en estos trabajos no analizaron si las mutantes que pierden su capacidad de oligomerizar tienen efectos en su capacidad de sinergizar a las toxinas Cry11 y Cry4 en la acción insecticida.

Con base en los experimentos antes mencionados, donde se observa que las regiones de las hélices α -A y α -C podrían ser las responsables de la formación de oligómero de la toxina Cyt2A, se propone hacer un análisis de diversas mutantes en las hélices α -A y α -C de la toxina Cyt1Aa. Esto permitirá relacionar la capacidad de formar oligómero, con la actividad de la toxina y con la capacidad de sinergizar toxinas Cry en la acción insecticida hacia mosquitos.

3 HIPÓTESIS

La oligomerización de la toxina Cyt1Aa es necesaria para ejercer su acción insecticida, hemolítica y sinérgica con la toxina Cry11Aa. Además de ser necesaria para su inserción en membrana.

4 OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de las hélices α -A y α -C en la actividad de la toxina Cyt1Aa *in vivo* e *in vitro*.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Construir mutaciones en las regiones α -A y α -C de la toxina Cyt1Aa.
- Caracterizar la capacidad de oligomerización de las mutantes.
- Analizar si la oligomerización de Cyt1Aa es necesaria para la actividad hemolítica *in vitro* contra eritrocitos de conejo.
- Analizar si la oligomerización de Cyt1Aa es necesaria para la actividad insecticida *in vivo* contra mosquitos de *Ae. aegypti*.
- Determinar la capacidad de sinergismo de las mutantes de Cyt1Aa con la toxina Cry11A en la toxicidad hacia mosquitos.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con estos objetivos, se propuso analizar el efecto de introducir diversas mutaciones puntuales en la cara hidrofóbica de las hélices α -A y α -C, cambiando residuos hidrofóbicos por residuos cargados y analizar si estos cambios afectan la oligomerización de la toxina. Se planeó hacer en total nueve mutaciones sitio-específicas, tratando de abarcar toda la cara hidrofóbica de cada hélice.

A pesar de que las toxinas Cyt1Aa y VVA2 tienen alta similitud estructural (Figura 6), la identidad de secuencia entre ellas es muy baja (17 %), por lo que muchos residuos no están conservados en la secuencia. Sin embargo, se hizo un alineamiento de la secuencia de aminoácidos que forman estas estructuras, con el propósito de identificar los aminoácidos de la toxina Cyt1Aa que se encuentran en la cara hidrofóbica de las hélices α -A y α -C (Figura 7) y se planeó hacer mutaciones de estos residuos. Se seleccionaron aminoácidos que cubran la mayor parte de la cara hidrofóbica y que corresponden a las posiciones **a**, **d**, **e**, y **g** en la heptada de residuos utilizados para mostrar la organización de las hélices α . En la figura 7 se ilustran en color azul, los residuos de las hélices α -A y α -C de la toxina Cyt1Aa que se mutagenizaron en este trabajo. En la misma figura, se indica en color rojo los residuos mutagenizados que se han descrito en la hélice α -C de la cardiotoxina VVA2 y que resultaron afectados en la formación de oligómero, así como su actividad hemolítica.

5.1 Mutación sitio-dirigida

En este trabajo se analizaron nueve mutaciones en residuos alifáticos pertenecientes a la cara hidrofóbica de las hélices α -A y α -C, los residuos seleccionados se cambiaron por aminoácidos con carga con el fin de ayudar a desestabilizar las interacciones que forman el oligómero.

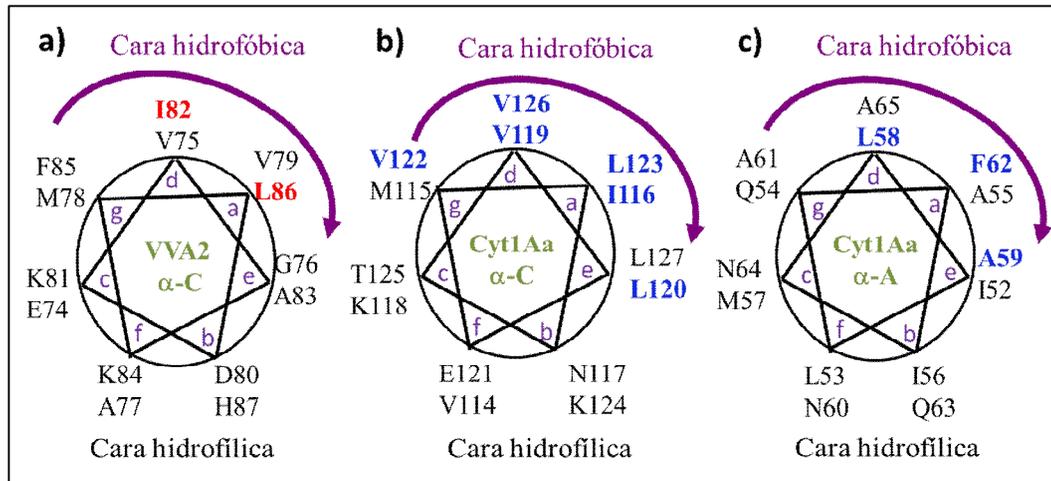


Figura 7. Representación de los residuos que conforman a las hélices α -A y α -C de la toxina Cyt1Aa y de la hélice α -C de VVA2. En color azul se muestran los residuos mutagenizados en este trabajo. En color rojo se esquematizan los residuos hidrofóbicos de VVA2 que fueron mutagenizados y que resultaron afectar su capacidad de formar oligómero y su actividad hemolítica de la toxina.

Los oligonucleótidos para mutar el gen de *cyt1Aa* se diseñaron según las especificaciones del kit de mutagénesis dirigida QuikChange XL Site-Directed Kit, Stratagene, las cuales se especifican en la Tabla 3. Cada oligonucleótido debe tener una longitud entre 25 y 45 pares de bases (pb). Los oligonucleótidos deben tener una temperatura de alineamiento (T_m) ≥ 75 °C. La T_m se calcula usando la siguiente fórmula: $T_m = 81.5 + 0.41 (\%GC) - (675/N) - (\% \text{ mutaciones})$. Donde: %GC = porcentaje de Citocinas y Guaninas, N= la longitud del oligonucleótido (número de pb), % mutaciones = $[100\% \times (\text{número de pb cambiadas})] / N$. El oligonucleótido se debe diseñar de tal forma que en la secuencia, el codón que lleva la mutación, vaya al centro de la secuencia y debe haber de 10-15 pb complementarias al templado para cada lado. El porcentaje óptimo de GC debe ser de alrededor de 40%, y el extremo 3' de cada oligonucleótido debe tener más de una base G o C. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la compañía SIGMA-ALDRICH.

Tabla 3: Diseño de oligonucleótidos para generar los genes de las toxinas mutantes de Cyt1Aa.
La secuencia de cada codón mutado se marcó en letras negritas y subrayadas.

Residuo- Cambio	Secuencia de los oligonucleótidos
L58E	5'-TATATATTGCAAGCAATTATG <u>GAA</u> GCAAATGCGTTTCAAATGC-3'
A59E	5'-TATATTGCAAGCAATTATGTTA <u>GAA</u> AATGCGTTTCAAATGC-3'
F62R	5'-AGCAATTATGTTAGCAAATGCAC <u>CGG</u> CAAAATGCGTTAGTTCC-3'
I116E	5'-CAA GTA AGT GTT ATG <u>GAA</u> AAT AAA GTC TTA GAA GTG-3'
V119E	5'-AGT GTT ATG ATT AAT AAA <u>GAA</u> TTA GAA GTG TTA AAA ACT G-3'
L120K	5'-TT ATG ATT AAT AAA GTC <u>AAA</u> GAA GTG TTA AAA ACTG-3'
V122E	5'-TGATTAATAAAGTCTTGGA <u>GAG</u> TAAAAACTGTATTAGGAGTTGC-3'
L123K	5'-AAA GTC TTA GAA GTG <u>AAA</u> AAA ACT GTA TTA GGA GTT GC-3'
L126E	5'-GTC TTA GAA GTG TTA AAA ACT <u>GAA</u> TTA GGA GTT GCA TTA AGT GG-3'

Las mutaciones se obtienen mediante una reacción de mutagénesis sitio-específica sobre un fragmento de DNA parental, el cual es la secuencia nucleotídica de la toxina Cyt1Aa silvestre, que está clonada en el plásmido pWF45 (Wu y Federici, 1993). Este plásmido contiene diferentes resistencias a antibióticos para seleccionar las posibles clonas positivas en *Escherichia coli* ampicilina (amp) [100 µg/ml] y en *B. thuringiensis* eritromicina (erm) [10 µg/ml].

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo son:

X-L1 blue: Es una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) para amplificar el plásmido pWF45 seleccionado por medio su resistencia a ampicilina. Este plásmido contiene el gen de la protoxina Cyt1Aa silvestre y se utilizó como templado para la construcción de las mutantes.

Bt-407: Es una cepa de *Bacillus thuringiensis* acristalífera, en donde se transformaron los plásmidos que contienen las diferentes mutaciones de la toxina Cyt1Aa.

5.2 Reacción de PCR mutagénico

La reacción de PCR mutagénico se prepara de acuerdo a las especificaciones del Kit de mutagénesis. La reacción se hace en un volumen final de 25 μ l y se prepara usando los reactivos descritos en la Tabla 4.

Tabla 4: Reactivos usados para cada una de las reacciones de PCR mutagénico.

Reactivo	Volumen
Solución de la Taq polimerasa (10% de la reacción)	2.5 μ l
Mezcla de dNTP's	1.0 μ l
QuikSolution (agregar para plásmidos \geq 5 Kb)	0.75 μ l
Oligonucleótido mutagénico	100 ng
Templado (<i>cytIAa</i> silvestre)	200 ng
Enzima QuikChange	1.0 μ l
Agua para completar 25 μ l de la reacción	

Se programa el termociclador con las siguientes temperaturas y tiempos: 95 $^{\circ}$ C durante 3 minutos, 30 ciclos con las siguientes temperaturas: 95 $^{\circ}$ C durante 1 minuto, 55 $^{\circ}$ C durante 1 minuto y 65 $^{\circ}$ C durante 15 minutos y finalizados los 30 ciclos, se usa una temperatura de 65 $^{\circ}$ C durante 10 minutos.

Terminada la reacción de PCR mutagénico, se agrega 1 μ l de la enzima DpnI (del Kit de mutagénesis dirigida), se agita fuertemente en vórtex y se incuba 1 hora a 37 $^{\circ}$ C. La enzima DpnI (corta DNA metilado) se usa para cortar DNA parental. Después de este tiempo de incubación, se purifica el producto de la reacción de PCR-DpnI usando el Kit de purificación de DNA de QIAGEN[®] PCR MinElute, y usando el protocolo de purificación por columnas de membrana de sílica para microcentrífuga. El DNA purificado se resuspende en 20 μ l de solución EB del mismo Kit comercial (10 mM Tris-Cl, pH 8.5).

5.3 Preparación de células electrocompetentes de *E. coli*

Se siembra la cepa *E. coli* X-L1 blue en una caja con medio LB/tetraciclina (tetra [12.5 µg/ml]) y se deja toda la noche (T.N.) a 37°C. A partir de esta caja se hace un precultivo de 10 mL en un matraz estéril con medio LB/tetra [12.5 µg/ml] a partir de una sola colonia y se deja el cultivo T.N. en agitación 180 rpm a 37 °C. Se prepara 1 L de medio LB en un matraz y a este matraz se le agrega los 10 ml del precultivo. El matraz con el litro de cultivo se deja agitando aproximadamente cuatro horas a 37 °C hasta obtener una Densidad Óptica de 600 nm ($D.O_{.600}$) = 0.4–0.6. Es recomendable monitorear el cultivo cada hora hasta tener la densidad óptica deseada del cultivo. Una vez llegada a esta $D.O_{.600}$, el cultivo se incuba en hielo durante 10 minutos.

A partir de este momento todo se trabaja en hielo y el material y reactivos empleados para la preparación de las células electrocompetentes deben estar previamente esterilizados y enfriados.

El cultivo se divide en cuatro botellas de 250 ml para centrífuga Nalgene y se centrifuga durante 10 minutos a 4000 rpm y a 4°C usando una centrífuga refrigerada Beckman Avanti J301, con un rotor JA10. Una vez centrifugado el cultivo se desecha el sobrenadante, y la pastilla formada en cada una de las cuatro botellas se junta en una sola botella, la cual se lava con 250 ml de Glicerol al 10 %, resuspendiendo de manera suave la pastilla. Nuevamente se centrifuga durante 10 minutos a 4000 rpm a 4 °C. Este procedimiento se hace tres veces en total. Después del tercer lavado, se desecha el sobrenadante y resuspende la pastilla usando 1-2 ml de Glicerol 10 % y se hacen alícuotas de 100-150 µl de células electrocompetentes (las alícuotas se colocan en hielo seco para congelar las células inmediatamente después de colocarlas en los tubos para su almacenamiento). Estas alícuotas pueden permanecer varios meses almacenadas a -70 °C para su posterior uso.

Reactivos: para preparar 1 L de **Medio LB (Lysogeny-Broth)**, se pesan 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Se afora a 1 L de agua destilada y se esteriliza en autoclave a 120 °C durante 25 minutos.

El Glicerol 10 % se prepara haciendo una dilución de 100 ml de Glicerol 100 % en 1000 ml de agua destilada y se esteriliza en las mismas condiciones que el medio LB.

5.4 Transformación de células de *E. coli*

El método usado para transformar las células de *E. coli* con el plásmido que contiene el DNA mutado, fue por electroporación. Para ello, se usaron las células electrocompetentes de *E. coli* X-L1 blue.

Se purifica el DNA que se obtiene de la reacción del PCR mutagénico usando el kit de purificación de muestras de PCR de QIAGEN®, usando las especificaciones del fabricante y resuspendiendo en un volumen final de 10 µl de agua. Una vez purificado el DNA, se usa todo el volumen purificado para transformar 150 µl de células electrocompetentes. Esta mezcla se pasa a la cubeta de electroporación (previamente enfriada en hielo) y se transforman las células usando un electroporador “GENE PULSER” de BioRad™. Las condiciones de electroporación son: Cubeta: 0.1 cm, voltaje: 1.3 volts, resistencia: 200 Ohm y capacitancia: 25 µF. Inmediatamente después del pulso, se recupera las células usando 1 ml de medio LB sin antibiótico y se pasa todo el contenido a un tubo de ensayo estéril. Se incuba 1 hora a 37 °C en agitación. Pasado el tiempo de recuperación, se platea 300 µl de esta suspensión de células de *E. coli* en caja LB/amp [100 µg/ml]. Las cajas se incuban durante dos días a 25°C.

Una vez que se tienen colonias candidatas de la transformación, se extrae el plásmido como se explica a continuación. Se manda a secuenciar usando el oligonucleótido IRE 1d (ver sección 5.7 de Materiales y Métodos) para comprobar

que el plásmido contenido en la colonia de *E. coli* tenga la mutación deseada. La extracción de DNA se hace usando el kit de extracción de DNA de QIAGEN®, usando las especificaciones del fabricante. Se extrae DNA de un cultivo de 5 ml de medio LB/amp [100 µg/ml] de la clona candidata seleccionada que ha crecido en agitación T.N. a 37 °C. El DNA plasmídico obtenido se guarda a -20 °C para su mejor conservación.

5.5 Preparación de células electrocompetentes de *B. thuringiensis*

El siguiente paso es transformar la cepa de *B. thuringiensis* acristalífera Bt-407 con el DNA plasmídico que lleva la mutación extraído de la cepa de *E. coli*. Las células electrocompetentes de *B. thuringiensis* se preparan el mismo día que se van a usar, ya que estas células no pueden ser almacenadas.

Para preparar las células competentes de *B. thuringiensis* se requiere tener todos los reactivos y el material en frío. La preparación de células competentes de *B. thuringiensis* se hace el mismo día que se transforma, sin embargo, la preparación empieza dos días antes. El primer día, se platea la cepa acristalífera Bt-407 en una caja con medio LB sin antibiótico y se deja T.N. a 30 °C. Al día siguiente, se hace un precultivo de 50 ml de medio LB a partir de una colonia seleccionada de la caja y el cultivo se deja también T.N. a 30 °C. En el tercer día, se toma 1 ml del precultivo para inocular 100 ml de medio BHI sin antibiótico. Este cultivo, se incuba en agitación a 180 rpm, a 30 °C hasta obtener una $D.O_{.600} = 0.6$ (aproximadamente durante dos hora y media), pero se recomienda hacer una lectura cada hora para revisar que el cultivo llegue a la D.O. deseada. Llegada a la $D.O_{.600} = 0.6$ se coloca el matraz en hielo durante 10 minutos. Dividir el cultivo en dos tubos estériles y centrifugar a 4 °C, durante 5 minutos a 3214 rfc en un rotor F-34-6-38, en una centrífuga marca Eppendorf 5804R. Desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla usando pipeta (nunca en vórtex) en 50 ml de solución EB estéril y fría (su formulación se describe más adelante). Centrifugar nuevamente 5 minutos y desechar el sobrenadante. Posteriormente resuspender la pastilla en 1 ml de solución EB fría y

hacer alícuotas de 350 μ l usando tubos estériles de 500 μ l e inmediatamente meter en hielo.

Reactivos: para preparar 1 L de **Medio BHI:** se pesa 37 g de BHI deshidratado, y se afora a 1 L y posteriormente se esteriliza en autoclave a 120 °C durante 25 minutos.

Solución EB: para 200 ml pesar 42.18 g de sacarosa (0.625 M), 0.04 g de $MgCl_2$ (1 mM), aforar a 200 ml de agua y esterilizar en las mismas condiciones que medio BHI.

5.6 Transformación de células electrocompetentes de *B. thuringiensis*

Se requieren 4 μ g de DNA plasmídico para transformar la cepa Bt- 407. Una vez purificado y cuantificado el DNA mutado, se agrega a un tubo que contiene 350 μ l de las células electrocompetentes de *B. thuringiensis* (recién preparadas) y se incuba durante 5 minutos en frío. Esta mezcla se pasa a la cubeta de electroporación y se transforman las células usando las siguientes condiciones de electroporación: Cubeta: 0.4 cm, voltaje: 2.5 volts, resistencia: 1000 Ohm y capacidad: 25 μ F. Después del pulso, se incuba 5 minutos en hielo (aún en la cubeta de electroporación). Se recupera las células usando 700 μ l de medio BHI sin antibiótico y se pasa todo el contenido a un tubo de ensayo estéril. Se incuba 1 hora a 30 °C en agitación a 180 rpm. Pasado el tiempo de recuperación, se plateó 300 μ l del tubo en las cajas LB/erm [10 μ g/ml] y finalmente se ncuban las cajas T.N. a 30 °C.

Una vez que se tienen clonas candidatas seleccionadas por su resistencia a eritromicina, se comprueba que sean clonas positivas haciendo una reacción de PCR en colonia como se explica en la sección 5.7 y se manda a secuenciar el producto obtenido de 750 pb que equivale al gen completo de *cytIAa*.

5.7 PCR de colonia

Para hacer la reacción de PCR de colonia se usa como templado un macerado de células de las colonias candidatas en *B. thuringiensis* obtenidas por un choque térmico. Para obtener estas colonias se siembran en una caja Petri (medio LB/erm [10 µg/ml]) y se incuban a 30 °C durante 6 horas, para tener las células en estado vegetativo. Se comprueba que el cultivo está en estado vegetativo analizando una muestra en el microscopio, ya que la fase vegetativa es claramente diferenciable porque se observan las bacterias en forma de bacilos, en cambio, en un cultivo completamente esporulado, sólo se observan las esporas y los cristales (Anexo 1).

Posteriormente, se toma con un asa de siembra una muestra de la colonia y se resuspende en 100 µl de agua estéril y se agita en vórtex durante 30 segundos para resuspender la muestra. Una vez resuspendida la muestra, se congela a -70 °C durante 30 minutos. Pasado ese tiempo, se hierven las muestras durante 10 minutos y se da un pulso de 2 segundos en la microcentrífuga. El templado que se utiliza en la reacción de PCR en colonia, son 5 µl del sobrenadante de esta muestra sometida al choque térmico.

Para la reacción de PCR, se prepara una mezcla que lleva todos los componentes (Tabla 5) excepto el templado. Esta mezcla se prepara para todas las muestras que se desea analizar y se agregan 20 µl de este coctel de reactivos a cada tubo donde se llevará a cabo la reacción, previamente etiquetado. Posteriormente, a cada tubo se le agregan 5 µl del templado.

Se usa el juego de oligonucleótidos IRE1d-IRE4r para comprobar la presencia del gen completo *cytIAa* en cada colonia candidata. Para hacer la secuenciación, se usa el oligonucleótido IRE1d (oligonucleótido derecho).

Se programa el termociclador con las siguientes condiciones: 94 °C durante 4 minutos y 30 ciclos con las siguientes temperaturas: 94 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto. Finalmente un ciclo de 7 minutos a 72 °C. Cuando se ha completado la reacción de PCR, se comprueba que los productos obtenidos sean del tamaño esperado en un gel de agarosa al 1% y se resuelven las bandas en una electroforesis durante 50 minutos a 90 Volts.

Tabla 5: Reactivos usados para cada reacción de PCR en colonia

Reactivo	Volumen
Buffer de Taq polimerasa (10% de la reacción)	2 µl
dNTP's	2 µl
MgCl ₂	2 µl
oligonucleótido derecho IRE1d	50 pmoles
oligonucleótido inverso IRE4r	50 pmoles
Enzima Taq polimerasa	1 µl
Agua para completar 20 µl de la reacción	

5.8 Producción de cristales de las toxinas mutantes de Cyt1Aa (Cyt1Aa*)

Las cepas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* que expresaron cada una de las toxinas mutantes de Cyt1Aa (Cyt1Aa*) se siembran en cinco cajas cada una, con medio de esporulación SP/erm [10 µg/ml] y se dejan crecer durante cuatro días a 30 °C, hasta su fase de esporulación. Pasado el tiempo de esporulación, se analiza en el microscopio una muestra de cada mutante para comprobar que el cultivo esté completamente esporulado y que se formen cristales semejantes a los cristales de la cepa silvestre.

Medio SP: para preparar 500 ml de este medio se pesa 4 g de caldo nutritivo en polvo, 0.125 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g de KCl, se ajusta a pH 7.0 y se afora a 500 ml de agua destilada. Se agrega 500 μ l de la solución $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.01 M filtrada y se esteriliza en autoclave a 120 °C durante 25 minutos.

Antes de colocar este medio en cajas Petri, se suplementa con 1 ml de la solución Fe_2SO_4 1N (previamente esterilizada) y con 500 μ l de la solución $CaCl_2$ 0.5 M (previamente esterilizada).

5.9 Purificación de espora-cristal (Sp-C) de las toxinas Cyt1Aa*

Una vez que el cultivo ha esporulado, se colecta el material en un tubo marca Falcon estéril de 50 ml y se agrega 30 ml del buffer EDTA 0.01 M con pH 8, NaCl 0.3 M. Se centrifuga a 4 °C, durante 10 minutos a 12857 rfc usando un rotor F-34-6-38, en una centrífuga marca Eppendorf 5804R y se desecha el sobrenadante, se repite tres veces este lavado. Después del tercer lavado, se resuspende la pastilla en 30 ml de agua + PMSF 1 mM, se centrifuga nuevamente durante 10 minutos usando las condiciones ya descritas, y se desecha el sobrenadante, este procedimiento se repite tres veces. Después del tercer lavado, se resuspende la pastilla en un volumen entre 5-10 ml de agua + PMSF 1 mM según sea el tamaño de la pastilla. Para conservar mejor la espora-cristal (Sp-C) colectada de cada mutante y la toxina silvestre, se almacena a -20 °C.

Es importante analizar la muestra de Sp-C para asegurarse de que se produce la proteína estable y que no se degradó durante la purificación por las proteasas endógenas de la bacteria. La muestra purificada se resuelve usando electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15 % y posteriormente los geles se tiñen con azul de Coomassie (BioRad).

5.10 Análisis de la estabilidad de las toxinas Cyt1Aa*

La estabilidad de las proteínas obtenidas se analiza corroborando la solubilización de las toxinas mutantes, la cual debe ser semejante a la toxina Cyt1Aa silvestre. La solubilización se hace (v:v) incubando 10 µg de Sp-C en una solución amortiguadora de carbonatos (Na₂CO₃ 50 mM) suplementada con dithiothreitol (DTT) 10 mM y pH 10.5. La muestra de espora cristal se centrifuga a 4 °C, durante 10 minutos a 16100 rfc en un rotor F45-42-11, usando una centrífuga marca Eppendorf 5415R y se desecha el sobrenadante. La pastilla que queda, se resuspende en la solución de carbonatos antes descrita y se incuba durante una hora a 37 °C y se agita a 600 rpm. Después se centrifuga nuevamente a 4 °C, durante 10 minutos a 16100 rfc y se colecta el sobrenadante. La toxina solubilizada (protoxina) se resuelve usando electroforesis desnaturizante en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15%. Posteriormente los geles se tiñen con azul de Coomassie (BioRad).

5.11 Activación de las toxinas Cyt1Aa y Cyt1Aa*

Usando la protoxina soluble, se analiza la activación de la proteína por proteasas para generar el fragmento de toxina activa resistente a proteólisis. La reacción de activación se hizo utilizando dos proteasas diferentes, la proteinasa K y la tripsina. Se estableció la relación adecuada de proteasa a emplearse, usando 10 µg de protoxina y diferentes concentraciones de proteinasa K o tripsina. Las proporciones usadas para la activación con las proteasas fueron (masa:masa): **1:5, 1:10, 1:20, 1:50 y 1:80 y 1:100** (proteasa:protoxina), manteniendo siempre constante 10 µg de protoxina. Para la reacción con proteinasa K solo se exploró hasta la relación 1:80 y se incubó una hora a 37 °C con agitación suave. La reacción con tripsina se incubó dos horas a 30 °C con agitación suave. Finalmente, las muestras se resuelven usando electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15%. Posteriormente los geles se tiñen con azul de Coomassie (BioRad).

5.12 Preparación de liposomas con lípidos sintéticos de fosfatidilcolina, estearilamina y colesterol

Los liposomas unilaminares pequeños (SUV, por sus siglas en ingles “Small Unilaminar Vesicles”) se preparan a partir de una mezcla de tres lípidos: fosfatidilcolina (**PC**) purificado de huevo y almacenado en cloroformo, colesterol sintético (**Ch**) almacenado en una mezcla cloroformo:metanol (1:2); ambos lípidos de la marca Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL.) y estearilamina sintética (**Sa**) almacenada en la mezcla de cloroformo:metanol (1:2) de la marca Sigma (St Louis, MO). Los tres lípidos se mezclan en una proporción molar 10:3:1 en un tubo de vidrio a una cantidad final de 0.650 μ mol. Se secan por evaporación al vacío T.N. en Savant (Speed Vac SVC100) para eliminar los residuos de solvente. Los lípidos se hidratan en 0.650 ml de 10 mM CHES, 150 mM KCl y pH 9 durante 30 minutos y después de incubar, se agitan en vortex. Hasta este paso se tienen vesículas multilaminares de diversos tamaños, para preparar las SUV se sónica la muestra de lípidos hidratados con pulsos de 20 segundos por 6-8 veces en un sonicador de baño Branson-1200 (Danbury, CT). Las SUV se pueden almacenar hasta por cuatro días después de su preparación, sin embargo, se recomienda usarlos el mismo día de la preparación para mayor efectividad.

5.13 Ensayos de oligomerización de las toxinas Cyt1Aa y Cyt1Aa*

La oligomerización de la toxina Cyt1Aa se induce por incubación de la protoxinas con SUV compuestos de PC:Ch:Sa en una relación 10:3:1 respectivamente.

La oligomerización de la toxina Cyt1Aa se puede inducir tanto con tripsina como con proteinasa K y esencialmente los reactivos empleados en estas reacciones no varían, a no ser por la proteasa en sí (y la relación proteasa:protoxina). Las variantes dependiendo de si se usa proteinasa K o tripsina, son las condiciones de la

reacción: el tiempo y temperatura de incubación estandarizada para cada enzima (Tabla 6).

Transcurrida la incubación de las activaciones con SUV, las muestras fueron centrifugadas 30 minutos a 117000 rfc a 4 °C en una ultracentrífuga de mesa modelo OptimaMax de Beckman con un rotor TLA-100. Se colectó el sobrenadante en un tubo para analizarlas mediante “western-blot” como la fracción soluble.

Las pastillas resultantes se lavaron con 80 µl de solución CHES y pH 9 (la misma solución en la que se resuspenden los liposomas) y se volvió a centrifugar, ahora durante 25 minutos a 139000 rfc a 4 °C. El propósito fue separar los SUV con la toxina unida a la membrana, de la toxina que haya quedado en el sobrenadante. El sobrenadante de esta segunda centrifugación se desechó y la pastilla de cada muestra, obtenida de esta segunda centrifugación, se analizó en un gel SDS-PAGE 15 %.

Tabla 6. Reactivos y condiciones usados durante la reacción de oligomerización, usando proteinasa K y tripsina.

	proteinasa K (1:10)	tripsina (1:20)
Liposomas (SUV)	90µl	90µl
Protoxina	200ng	200ng
Proteasa	20ng	10ng
Incubación	1 hora 37 °C, agitación	2 horas 30 °C, agitación
PMSF (para detener la reacción)	1mM	1mM

5.14 Western-Blot

Las muestras obtenidas en la reacción de oligomerización, ya sea las pastillas o fracción soluble, se resuelven en un gel SDS-PAGE 15 % y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (PVDF Immobilon-P Milipore) durante 12 horas a 150 mA y a 4 °C (cuarto frío), en cámara húmeda. Cada membrana se bloquea con leche baja en grasa (Svelty® de Nestle) al 5 % en PBS, una hora en agitación a 80 rpm y a temperatura ambiente. Después de bloquear las membranas, se hacen dos lavados de cinco minutos cada uno con PBS-tween al 0.1%. Posteriormente, se incuba a cada membrana una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario anti-Cyt 1/11 (donado por el Dr. Sarjeet Gill), en la proporción 1:30000 en PBS-tween 0.1%. Las membranas se lavan dos veces con PBS-tween 0.1% incubando cinco minutos en cada lavado. El siguiente paso es incubar a cada membrana con el segundo anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa (de Santa Cruz), en una relación 1:10000 por una hora a temperatura ambiente y agitación suave, en PBS-tween 0.1%. Las membranas se lavan dos veces con PBS-tween 0.1% incubando cinco minutos en cada lavado. Posteriormente la señal de la interacción se visualiza usando el reactivo Luminol (Thermo SCIENTIFIC) sobre una película fotográfica (Amersham, Hyperfilm™ ECL).

5.15 Ensayo de hemólisis

Los ensayos de hemólisis se realizan con sangre recién extraída de conejo. Se colectó 1 ml de sangre de conejo en un tubo Falcón con 45 ml de solución A (amortiguador anticoagulante) en frío. Posteriormente, se lava la sangre 3-5 veces con el fin de eliminar plasma sanguíneo y otros componentes de la sangre. Los lavados se hacen usando la solución A. Se divide el contenido del tubo Falcón en dos tubo de vidrio de 30 ml, usando una pipeta Pasteur de plástico. Después de equilibrar ambos tubos para que cada uno contenga 20 ml y se centrifugan durante 5 minutos a 804 rfc a 4 °C en una centrífuga marca Eppendorf 5804R con rotor F-34-6-38. Se desecha el sobrenadante usando la pipeta Pasteur de plástico, jamás se vierte el

contenido, ya que la pastilla formada es poco compacta y se separa con facilidad. Los lavados se realizan hasta que el sobrenadante sea transparente.

Una vez que se ha limpiado los eritrocitos, se hace una curva de calibración de porcentos de hemólisis. Para analizar el 100 % de hemólisis se agregan 900 μ l de agua destilada más 100 μ l de eritrocitos en un tubo Eppenderof de 1.5 ml. El punto de 0 % hemólisis se hace usando 900 μ l de solución A y 100 μ l de eritrocitos. Estas mezclas se agitan suavemente y se centrifugan a 4 °C, durante 5 minutos a 600 rfc en una centrífuga marca Eppenderof 5415R con rotor F45-24-11. Posteriormente se recupera el sobrenadante y se lee la absorbancia del sobrenadante a D.O.₄₀₅ nm. Para poder usar los eritrocitos en este ensayo, se deberán concentrar por centrifugación o diluir con una solución A (ver composición más adelante) hasta obtener valores de D.O.₄₀₅ = 1.0-1.1 cuando se mida el 100 % de lisis, y valores de D.O.₄₀₅ = 0.01-0.03 cuando se mida el 0 % de lisis.

La reacción de hemólisis se hace en un volumen final de 200 μ l, de los cuales, 20 μ l son eritrocitos calibrados con amortiguador A más las siguientes concentraciones: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 1000 ng/ml de toxina Cyt1A silvestre o toxina mutante activadas con tripsina (1:20) y se completa hasta el volumen total de reacción de 200 μ l con solución A. Las mezclas se incuban por 30 minutos a 37 °C en placas de 96 pozos. Pasado el tiempo de incubación, se centrifuga a 4 °C, durante 5 minutos a 880 rfc en una centrífuga marca Eppendorf 5804R con un rotor A-2-MTP y se colecta el sobrenadante en una nueva placa de 96 pozos. La actividad hemolítica se mide cuantificando la liberación de hemoglobina al sobrenadante y midiendo a 405 nm en un espectrofotómetro marca Molecular Devices Emax. Como controles se usan eritrocitos incubados en agua, sin toxina (D.O.₄₀₅ = 1.0-1.1, ocurre el 100 % de la hemólisis) y eritrocitos incubados en solución A, sin toxina (D.O.₄₀₅ = 0.01-0.03, ocurre el 0 % de la hemólisis). Como blanco se usa el amortiguador A sin eritrocitos, ni toxina.

Solución A: para preparar 500 ml se pesan 9 g de Dextrosa anhidra (0.11 M), 2 g de cloruro de sodio (0.07 M), 2.9 g de citrato de sodio (0.02 M) y 0.21 g de ácido cítrico (0.002 M), se ajusta a un pH de 7.4 y se afora a 500 ml con agua destilada. Se filtra la solución usando filtros con un poro de 0.22 μm de diámetro y se almacena a 4 °C. Ésta solución no puede almacenarse durante mucho tiempo ya que se contamina fácilmente, por lo que se recomienda preparar la solución para emplearse en el momento que se va a usar.

5.16 Bioensayos con mosquitos

Los ensayos se hacen por triplicado usando 10 larvas de mosquito *Aedes aegypti* de cuarto instar en 100 ml de agua sin clorar para cada dosis analizada y diferentes lotes de toxina. Se utilizan entre cinco y diez diferentes concentraciones para obtener una curva de Concentración Letal Media (LC_{50} , la dosis que mata el 50 % de las larvas analizadas) de las toxinas Cyt1Aa o Cyt1Aa*, para esto, se emplearon las siguientes concentraciones: 50, 100, 300, 500, 700, 1000, 2500 y 5000 ng/ml. Después de 24 horas se cuantifican las larvas muertas y las larvas vivas. Los resultados se analizan estadísticamente para obtener la concentración letal media (LC_{50}) y los límites de confianza del 95 % con el programa Probit (Polo-PC LeOra Software).

Para obtener la LC_{50} de la toxina Cry11Aa se hizo lo mismo, pero se usaron las siguientes concentraciones: 10, 50, 100, 300, 500, 700 y 1000 ng/ml.

5.17 Análisis del sinergismo entre las toxinas Cyt1Aa* y toxina Cry11Aa silvestre

Para cumplir con el último objetivo de este trabajo, se analizó la capacidad de las toxinas Cyt1Aa y Cyt1Aa* de sinergizar a la toxina Cry11Aa silvestre para matar larvas de *Aedes aegypti*.

En el año 2010, Bravo y colaboradores, reportaron que la toxina Cyt1A es capaz de sinergizar a las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa para matar mosquitos de *Anopheles albimanus*, esto resulta relevante porque la toxina Cyt1Aa no es toxica contra este mosquito. En ese artículo se probó el sinergismo de una mezcla de toxinas aún y cuando una de ellas no sea tóxica contra el insecto blanco. Para demostrar el sinergismo, se usó la hipótesis de que la sobrevivencia que se observa ante la mezcla de dos toxinas, es igual al producto de la sobrevivencia observada ante la exposición con cada una de las toxinas probadas individualmente, por lo tanto, se presentaron una serie de ecuaciones que resuelven cual es la mortalidad esperada (mortalidad teórica) de una población de mosquitos expuestos a la mezcla de dos toxinas.

Entonces, para dos toxinas *a* y *b*, se tiene que:

$$S_{(mez)} \text{ EXP} = S_{(a)} \text{ OBS} \times S_{(b)} \text{ OBS}$$

a: Toxina Cyt1Aa
b: Toxina Cry11Aa

$S_{(mez)} \text{ EXP}$ es la proporción de larvas que se espera que sobrevivan a la exposición de la mezcla de ambas toxinas *a* y *b*. $S_{(a)} \text{ OBS}$ es la proporción observada de larvas que sobrevivieron a la exposición de la toxina *a*. $S_{(b)} \text{ OBS}$ es la proporción observada de larvas que sobrevivieron a la exposición de la toxina *b*. Cada valor de $S_{(toxina)} \text{ OBS}$ se calcula dividiendo: el número de larvas que sobrevivieron entre el número de individuos analizados en el experimento (**n**); en este trabajo se hicieron tres ensayos en diferentes días utilizando 10 larvas en cada ensayo, así que la $n = 30$ larvas. El Bioensayo se cuantificó hasta las 24 h para determinar el número de larvas vivas y muertas.

A partir de estas fórmulas, se puede calcular la mortalidad Teórica para una muestra de larvas que fueron tratadas con una mezcla de toxinas *a* y *b* usando la fórmula:

$$\text{Mortalidad Teórica} = (1 - S_{(\text{mez}) \text{ EXP}}) \times 100 \%$$

La Mortalidad Teórica se calcula para la mezcla de una sola dosis de toxinas y se compara con la Mortalidad Observada en el bioensayo usando esa misma dosis de mezcla de toxinas.

Para evaluar el sinergismo se planteó hacer un bioensayo donde se analizara la mortalidad que genera usar una mezcla de dos toxinas: las toxinas Cry11Aa y Cyt1Aa. Se planteó hacer esta mezcla usando la concentración letal menor al 20 % (LC₂₀) de toxina Cry11Aa más una dosis subletal de la toxina Cyt1Aa, menor al 10 % de mortalidad (Tabla 7:1.c), como controles se usa individualmente a las toxinas: Cry11Aa (Tabla 7:1.a) y Cyt1Aa (Tabla 7:1.b).

Para evaluar a cada toxina Cyt1Aa* se usó la misma dosis empleada con la toxina Cyt1Aa silvestre y se probó en combinación con la LC₂₀ de la toxina Cry11Aa (Tabla 7:2.c), como controles se usaron individualmente a las toxinas: Cry11Aa (Tabla 7:2.a) y Cyt1Aa* (Tabla 7:2.b).

Para hacer este bioensayo, se utilizaron 10 larvas de *Aedes aegypti* de cuarto instar en 100 ml de agua sin clorar, esto para cada mezcla de toxinas. Cada bioensayo se hace por triplicado, usando diferentes lotes de toxinas mutantes de Cyt1Aa, pero el mismo lote de la toxina Cry11Aa. Cada bioensayo se deja 24 horas y posteriormente se analizan los datos usando el programa Probit (Polo-PC LeOra Software).

Tabla 7. Concentraciones usadas en el bioensayo de sinergismo cualitativo.

Clave	Toxina	Dosis total
1.a)	Cry11Aa	LC ₂₀
1.b)	Cyt1Aa	< LC ₁₀
1.c)	Cry11Aa + Cyt1Aa	LC ₂₀ + (< LC ₁₀)
2.a)	Cry11Aa	LC ₂₀
2.b)	Cyt1Aa*	< LC _{10 (Cyt1Aa)}
2.c)	Cry11Aa + Cyt1Aa*	LC ₃₀ + (< LC _{10 (Cyt1Aa)})

6. RESULTADOS

6.1 Obtención de toxinas mutantes en las hélices α -A y α -C de Cyt1Aa

En este trabajo se mutagenizaron de manera puntual e independiente nueve residuos de la toxina Cyt1Aa, usando el Kit de mutagénesis sitio dirigida (Stratagene) como se describe en la sección 5.1 de Materiales y Métodos. Los residuos mutagenizados son: L58E, A59E, F62R (de la hélice α -A), I116E, V19E, L120K, V122E, L123K y V126E (de la hélice α -C) (Tabla 3).

Los genes mutados de cada toxina planeada, se lograron expresar satisfactoriamente en la cepa XL1Blue de *E. coli* y posteriormente en la cepa acristalífera 407⁻ de *B. thuringiensis*. Las mutaciones se comprobaron por secuenciación del DNA plasmídico.

6.2 Obtención de espora-cristal de cada mutante

De manera individual, se cultivaron las colonias de la cepa 407⁻ de *B. thuringiensis* que portaban el DNA plasmídico mutado, en medio específico (SP/erm 10 μ g/ml) para promover la esporulación. Las toxinas Cyt1Aa y Cyt1Aa* se cultivaron durante 4 días y antes de colectar el material, se corroboró por microscopía óptica que los esporangios ya hubieran liberado el cristal compuesto por las toxinas. Después de colectar el material, se lavó como se explica en la sección 5.9 de Materiales y Métodos.

El material colectado se analiza usando electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15 %, con el fin de corroborar la presencia de cada toxina mutante. Se analizó también la toxina Cyt1Aa como control positivo.

De las nueve toxinas Cyt1Aa* hechas, sólo L120K, V122E, L123K y V126E producen un cristal semejante en tamaño y cantidad a los cristales formados por la toxina Cyt1Aa (Figura 8.A). Las toxinas L58E, F62R e I116 analizadas por SDS-PAGE al 15 %, claramente mostraron tener menor cantidad de cristales que la toxina silvestre, aunque son cristales semejantes en tamaño (Figura 8.A).

Se observó que las toxinas A59E y V119E no producen cristales visibles en el microscopio (marcadas en color rojo en la Figura 8.A).

En todos los carriles del gel teñido con colorante Coomassie donde se analizaron las Sp-C de las toxinas Cyt1Aa y Cyt1Aa*, se muestran una serie de bandas de altos pesos moleculares que podrían ser otras proteínas producidas por *B. thuringiensis* durante la fase de esporulación (Figura 8.A) o bien, podrían ser agregados de las toxinas Cyt1Aa y Cyt1Aa*, sin embargo, no se hizo un análisis más exhaustivo de dichas bandas para saber qué proteínas son. También se observan bandas de pesos moleculares menores a la protoxina (Figura 8.A) y se piensa que podrían ser productos de degradación de la toxina, debido a la presencia de proteasas del cultivo que se mantuvieron si el material colectado, si éste, no se lavó adecuadamente.

6.3 Solubilización de las toxinas Cyt1Aa*

Se analizó la estabilidad de las toxinas Cyt1Aa* probando su solubilización en solución de carbonatos 50 mM con un pH de 10.5 y suplementado con DTT 10 mM, usando las condiciones descritas en la sección 5.10 de Materiales y Métodos. Es importante analizar este paso porque durante la solubilización se libera la protoxina del cristal para poder actuar contra su blanco específico. Esta solubilización se hace en condiciones alcalinas y reductoras semejantes a las encontradas en el intestino de las larvas de mosquitos.

Después del procedimiento de solubilización, se cuantificó la proteína usando el método de Bradford y se usó Albúmina de Suero Bovino (BSA por sus siglas en inglés) como proteína estándar para hacer la cuantificación. Las muestras se resolvieron usando electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15 % y se comparó la solubilización de cada toxina Cyt1Aa* con la solubilización de la toxina silvestre Cyt1Aa (Figura 8.B).

El resultado que se obtuvo muestra que las toxinas Cyt1Aa*: L120K, V122E, L123K y V126E se solubilizan de manera similar a la toxina Cyt1Aa y que se libera una proteína de 25 kDa del cristal (Figura 8.B). En cambio, durante la solubilización de los cristales de las toxinas L58E, F62R e I116E, las proteínas se degradan en las mismas condiciones a las que son sometidos los cristales de la toxina Cyt1Aa, ya que no se observa una proteína del mismo tamaño que la toxina silvestre (Figura 8.B). Este resultado nos indica que las mutantes L58E, F62R e I116E no son estables.

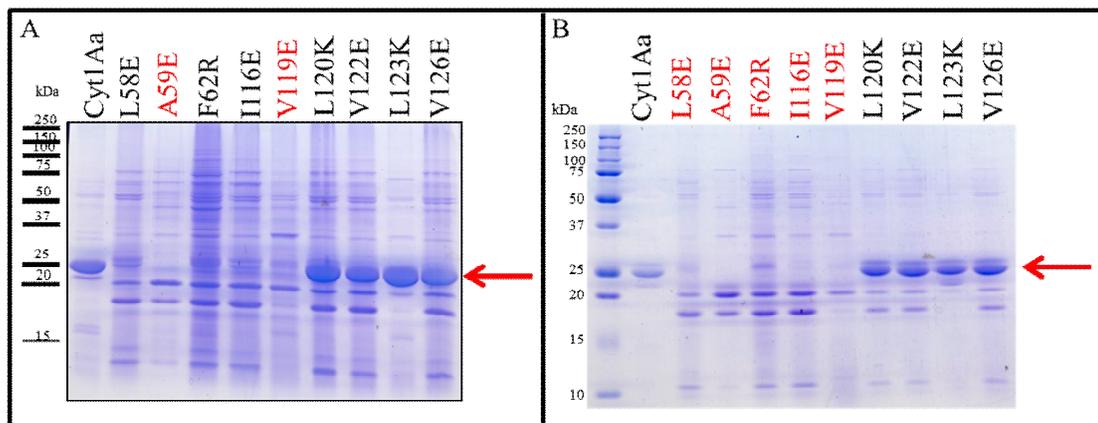


Figura 8. A) Análisis de los cristales (Sp-C) de la toxina Cyt1Aa y las toxinas Cyt1Aa*. En letras rojas se muestran las mutantes que no forman cristal. **B) Solubilización de las toxinas Cyt1Aa y Cyt1Aa*.** En letras rojas se muestran las toxinas que se degradan cuando son sometidas a las mismas condiciones de solubilización establecidas para la toxina Cyt1Aa. Una flecha roja en cada panel, muestra la proteína de interés. Cada gel fue cargado con 5 μ g de cada muestra. Geles de SDS-PAGE al 15 % teñidos con azul de Coomassie.

A pesar de no observar cristales de las mutantes A59E y V119E en el gel de poliacrilamida (Figura 8.A), las muestras fueron tratadas con solución de carbonatos para confirmar si era posible obtener proteína soluble, de un cristal posiblemente muy pequeño, para ser detectado a simple vista. Claramente se observa que estas mutantes no producen toxina o bien, son muy inestables y se degradan en las condiciones alcalinas y reductoras a las que son sometidas (Figura 8.B).

También se puede observar que en ambos geles (donde se muestra la Sp-C y las toxinas solubles), en los carriles correspondientes a las toxinas L58E, A59E, F62R, I116E, L120K, V122E y V126E aparecen dos bandas de bajo peso molecular (18-20 kDa) que suponemos pudieran ser productos de degradación de las toxinas, sin embargo, debido a que no se analizaron estas bandas, no se tiene la certeza si pudiera tratarse de alguna otra proteína.

6.4 Activación de la toxina Cyt1Aa silvestre

Antes de hacer la activación de las toxinas Cyt1Aa*, se probaron diferentes concentraciones de proteasas con la toxina Cyt1Aa silvestre para conseguir la condición óptima de activación y posteriormente, analizar las toxinas mutantes.

Para proteinasa K, se determinó que la mejor condición de activación fue usando la proporción 1:10 (proteínasa K:protoxina), ya que en concentraciones menores de proteinasa K (1:50 y 1:80) no se procesa toda la protoxina y por ello se puede ver un doblete de bandas, una de 25 kDa equivalente a la protoxina y otra de 24 kDa que es la toxina procesada (Figura 9.A, flechas punteadas). En el caso contrario, cuando se usan concentraciones muy altas de proteasa (1:5), la proteína empieza a degradarse, lo que genera un bandeo de bajos pesos moleculares (Figura 9.A, flecha continua).

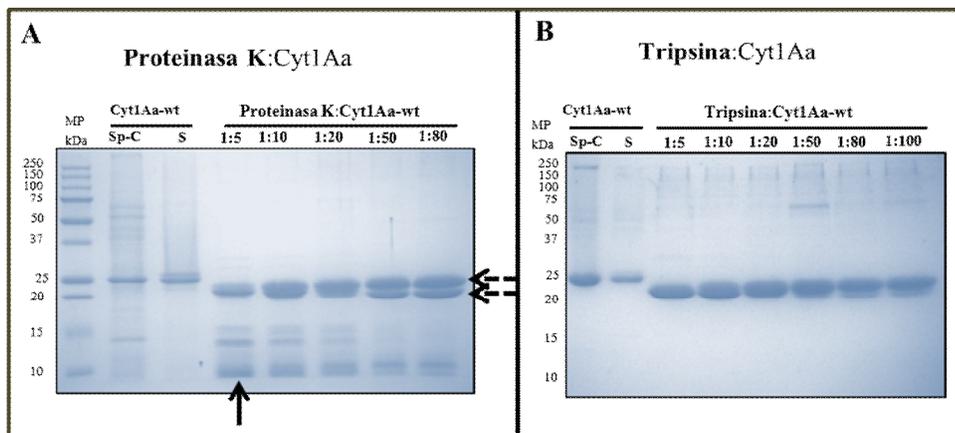


Figura 9. A) Activación de la toxina Cyt1Aa silvestre (Cyt1Aa-wt) usando proteinasa K. Se usaron diferentes concentraciones de proteinasa K:protoxina (1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:80), resultado ser 1:10 la proporción óptima para procesar la toxina Cyt1Aa. Las flechas punteadas muestran un par de bandas equivalentes a la protoxina de 25 kDa sin procesar y la toxina activada de 24 kDa. La flecha continua muestra las bandas correspondientes a los fragmentos de degradación de la proteína Cyt1Aa. **B) Activación de la toxina Cyt1Aa silvestre usando tripsina.** Se usaron diferentes concentraciones de tripsina:protoxina (1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:80, 1:100), resultando ser 1:20 la proporción óptima para procesar la toxina Cyt1Aa. **SP-C** = espora-cristal. **S** = toxina soluble. Cada gel fue cargado con 5 μ g de cada muestra. Geles de SDS-PAGE al 15 % teñidos con azul de Coomassie.

Cuando se usa tripsina, se observa que las concentraciones óptimas de activación se encuentran entre las proporciones 1:10 y 1:20 (tripsina:protoxina), porque se ha procesado completamente toda la protoxina, sin degradarse. Se decidió usar la concentración 1:20 porque tiene menor cantidad de proteasa y con ello se evita la degradación inespecífica de la proteína Cyt1Aa. Es importante señalar que en concentración muy bajas de tripsina, tampoco se procesa la protoxina (Figura 9.B).

6.5 Activación de las toxinas Cyt1Aa*

Una vez que se determinó la condición óptima de activación de la protoxina Cyt1Aa usando proteinasa K o tripsina, se analizó la activación de las toxinas mutantes en las mismas condiciones que la toxina silvestre.

Se decidió no hacer el tratamiento de proteasa a las toxinas mutantes L58E, A59E, F62R, I116E y V119E porque son sensibles a las condiciones de solubilización (Figura 8.B), así que no fue posible estimar la concentración de protoxina para hacer la activación. Sin embargo, se analizaron las toxinas Cyt1Aa*:

L120K, V122E, L123K y V126E y se comprobó que todas las toxinas son estables y se procesan de forma similar a la toxina silvestre, generando una banda de ~24 kDa cuando se procesan con proteinasa K (Figura 10.A) al igual que con el tratamiento de tripsina (Figura 10.B). Se usó la protoxina Cyt1Aa como control del peso de la toxina sin procesar (25 kDa) con las proteasas ya mencionadas.

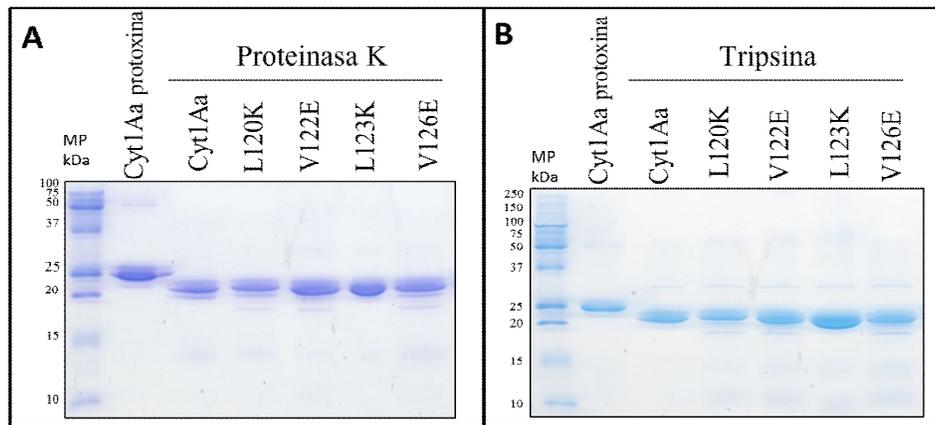


Figura 10. A) Procesamiento de las toxinas Cyt1Aa* usando proteinasa K. Las toxinas Cyt1Aa* se procesan de manera similar a la toxina Cyt1Aa (control), generando una banda de 24 kDa. Se usó la protoxina Cyt1Aa para observar la diferencia en tamaño de la toxina procesada. **B) Procesamiento de las toxinas Cyt1Aa* usando tripsina.** Al igual que con el procesamiento usando proteinasa K, se observa que las toxinas Cyt1Aa* se procesan de manera similar a la toxina Cyt1Aa y generan una banda de 24 kDa. Ambos geles SDS-PAGE 15 % se cargaron usando 5 µg de proteína y fueron teñidos con azul de Coomassie.

6.6 Ensayos de oligomerización

El siguiente paso en este trabajo fue analizar la capacidad de oligomerización de las toxinas Cyt1Aa y Cyt1Aa*, esta reacción de oligomerización se hizo usando solamente las toxinas que se procesan adecuadamente durante la activación. Después de realizar las reacciones de oligomerización, las muestras se ultracentrifugaron para separar la toxina que se unió a los SUV de la toxina que se mantuvo soluble y se calentaron durante 3 minutos a 65 °C, para posteriormente ser resueltas en un gel SDS-PAGE 15 %. Este gel se transfirió a una membrana de PVDF para ser analizado mediante “westrn blot”.

En los experimentos de oligomerización se usaron ambas proteasas para activar las protoxinas Cyt1Aa y Cyt1Aa*, como se explica en la sección 5.13 de Materiales y Métodos. Esto lo hicimos con el fin de explorar si existe alguna diferencia en el proceso de oligomerización, debido al corte diferencial que producen estas proteasas. Los resultados nos indican que sí existe una diferencia en la oligomerización al menos, en la mutante V126E.

En los experimentos de oligomerización de la toxina Cyt1Aa usando ambas proteasas, observamos que se forman agregados de alto peso molecular, incluso mayores a 250 kDa (máximo tamaño de referencia del marcador de pesos usado), por lo que no fue posible determinar el tamaño exacto de dicho agregado (Figura 11.B y 11.D). En la fracción unida a lípidos (pastilla) se detectó el oligómero de Cyt1Aa y no se observó proteína monomérica. En cambio, en la fracción soluble únicamente se detectó a la toxina como monómero (Figura 11.A y 11.C), lo que indica que el monómero no se inserta a los lípidos y solamente lo hace como oligómero.

Cuando se analizaron las toxinas L120K y L123K en las reacciones de oligomerización, también se observó al usar tripsina o proteinasa K, se forman agregados de alto peso molecular similares a la toxina Cyt1Aa, y que únicamente fueron detectados en la fracción unida a los lípidos (Figura 11.B y 11.D, respectivamente). Por lo tanto, se puede concluir que las mutantes L120K y L123K no están afectadas en su capacidad de formar oligómeros y que estas toxinas únicamente se insertan en las membranas en forma de oligómeros. También se observó que las proteínas monoméricas se mantienen en el sobrenadante, obtenidos de la ultracentrifugación (Figura 11.A y 11.C).

Se analizaron las mutantes V122E y V126E en la reacción de oligomerización hecha con tripsina, y se observó que estas mutantes no forman agregados de alto peso molecular y no se detectó a la proteína monomérica unida a los SUV (Figura 11. B), lo que sugiere que estas dos últimas mutantes están afectadas en la capacidad de formar esos agregados o estructuras oligoméricas, que sí forma la toxina silvestre. Y

nuevamente se observa que el monómero de las toxinas únicamente se detectó en el sobrenadante, lo que indica que no se insertó en los liposomas (Figura 11.A).

En cambio, cuando se analizó la oligomerización usando proteinasa K, se observó que la toxina V122E no forma oligómeros (Figura 11.D), en cambio, la mutante V126E parece que sí forma oligómeros, sin embargo, parecen ser menos estables que los que forma la toxina silvestre, ya que fácilmente se degradan en las condiciones desnaturizantes del gel (Figura 11.D). Y a pesar de que parece que el oligómero se degrada en las condiciones del gel desnaturizante, tampoco se ve monómero de la mutante V126E unido a los lípidos (Figura 11.D) y únicamente se detecta como proteína soluble (Figura 11.C).

Tanto en los geles donde se analizó la fracción de sobrenadantes, como en los geles donde se analizaron las pastillas separados por ultracentrifugación, se agregó a la protoxina Cyt1Aa, la cual no fue ultracentrifugada, ni tampoco incubada con liposomas. Esto, con el fin de tener un control de detección del anticuerpo anti-Cyt1Aa y para corroborar que la toxina Cyt1Aa no se autoagrega, ya que sólo se detectó en el tamaño correspondiente a 25 kDa (Figura 11.A, B, C y D). Las toxinas Cyt1Aa* y Cyt1Aa que fueron detectadas en la fracción soluble, se procesaron y generan una banda de 24 kDa.

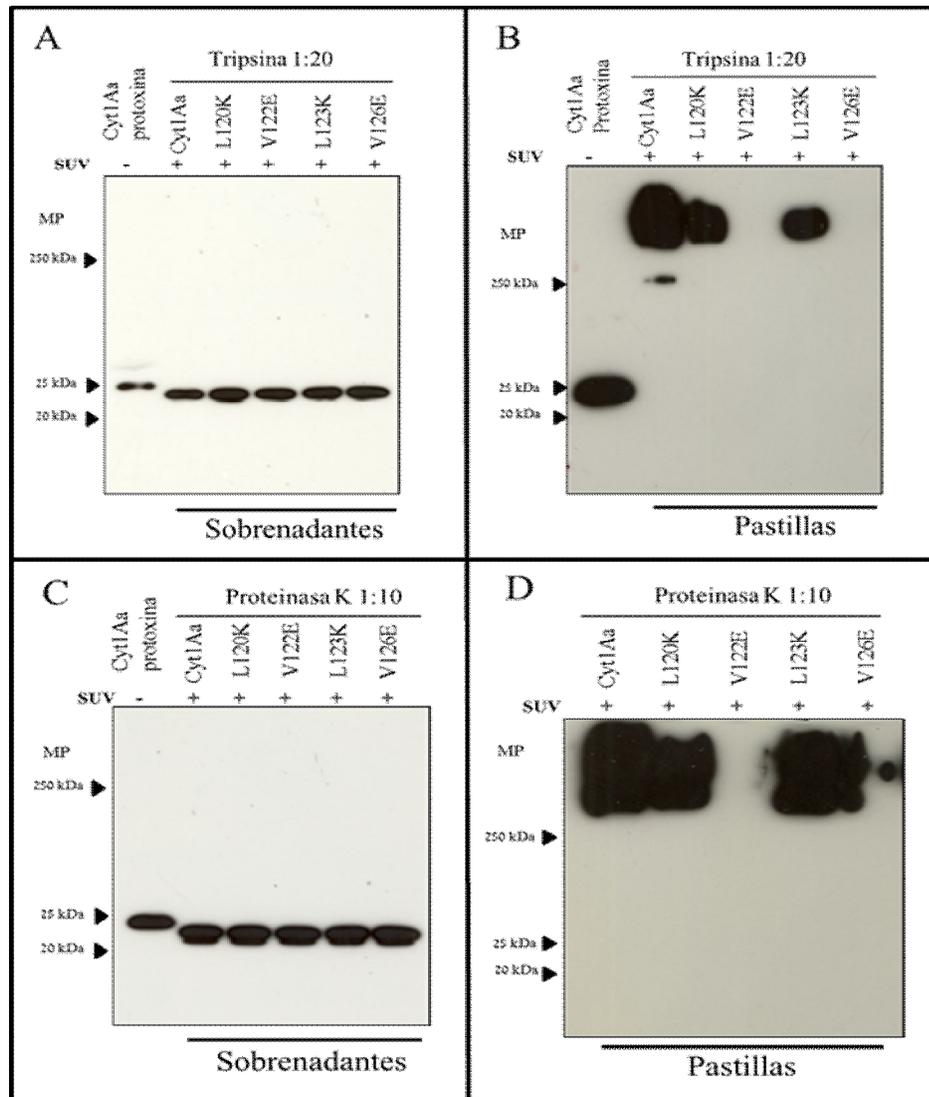


Figura 11. Análisis de la oligomerización de las toxinas Cyt1Aa y Cyt1Aa* en presencia de liposomas (SUV). **A) Sobrenadantes** obtenidos a partir de la ultra centrifugación de la reacción de oligomerización de la toxina Cyt1Aa y las toxinas Cyt1Aa*, hecha con tripsina. En esta fracción se observa únicamente la forma monomérica de las toxinas. **B) Pastillas** obtenidas de la reacción de oligomerización hecha con tripsina, después del segundo lavado usando ultra centrifugación. Se observa que en presencia de SUV las toxinas Cyt1Aa, L120K y L123K forman agregados de alto peso molecular que permanecen unidos a los liposomas aún después de lavar dos veces las pastillas, en cambio, las mutantes V122E y V126E no forman estos oligómeros de alto peso molecular. **C) Sobrenadantes** obtenidos después de ultra centrifugar la reacción de oligomerización hecha con proteinasa K. En esta fracción se observa únicamente la forma monomérica de las toxinas Cyt1Aa y Cyt1Aa*. **D) Pastillas** obtenidas después del segundo lavado usando ultra centrifugación de la reacción de oligomerización hecha con proteinasa K. Se observa que las toxinas Cyt1Aa, L120K, L123K y V126E forman agregados de alto peso molecular que permanecen unidos a los liposomas aún después de lavar dos veces las pastillas, en cambio, la mutante V122E no forma oligómeros. En los geles se usó la protoxina de Cyt1Aa para comparar el tamaño con las protoxinas procesadas a toxina. Todas las muestras se calentaron durante 3 minutos a 65 °C antes de resolverlas en un gel SDS-PAGE 15 %. Los geles fueron transferidos a una membrana de PVDF para ser analizados mediante western blot usando un anticuerpo policlonal anti-Cyt1Aa.

6.7 Ensayos de hemólisis con sangre de conejo

Los ensayos de hemólisis se hicieron con sangre de conejo proporcionada por el Bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para hacer los ensayos de hemólisis se probó la toxina Cyt1Aa y las toxinas mutantes: L120K, V122E, L123K y V126E activadas con proteinasa K. Las concentraciones de toxina analizadas fueron: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 1000 ng/ml (Figura 12).

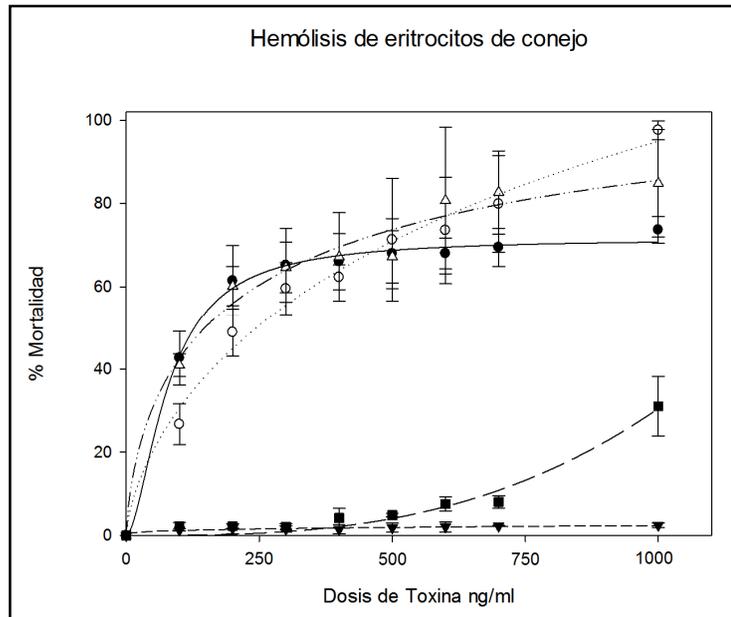


Figura 12. Análisis de la hemólisis de eritrocitos de conejo. Se usaron diferentes concentraciones de toxina Cyt1Aa y toxinas Cyt1Aa* activadas con tripsina. Se emplearon las mismas concentraciones de toxina con todas las mutantes, así como la toxina silvestre: [100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 1000 ng/ml] analizadas cada una por separado. La mutante L123K (triángulos blancos) tiene su DE_{50} = 150 ng/ml y se comporta como la toxina silvestre (círculos negros) que muestra una DE_{50} = 130 ng/ml. La mutante L120K presenta una DE_{50} = 250 ng/ml (círculos blancos). La mutante V126E (cuadrados negros) está severamente afectada en su capacidad hemolítica, comparada con la toxina silvestre ya que presenta una DE_{50} mayor a 1000 ng/ml. La mutante V122E (triángulos negros) no es hemolítica. Datos analizados con el paquete SigmaPlot 11.0.

Como se puede ver en la gráfica de la Figura 12, la toxina Cyt1Aa es hemolítica y presenta una Dosis Efectiva 50 (DE_{50} , la dosis donde el 50 % de las células se han lisado) de (130 ng/ml). Analizando las mutantes, se puede observar que la toxina L123K presenta una actividad hemolítica semejante a Cyt1Aa ya que su DE_{50} = 150 ng/ml, en cambio, la toxina L120K tiene su DE_{50} = 250 ng/ml (Figura 12). Aunque a simple vista parece que la afinidad de la toxina L123K por las

membranas de eritrocitos sea mayor ($DE_{50} = 150$ ng/ml), que la de la toxina L120K ($DE_{50} = 250$ ng/ml), ambas alcanzan un máximo de 100 % de hemólisis en la máxima concentración analizada (1000 ng/ml), probablemente porque a mayores concentraciones de toxina, se saturan los sitios de interacción en las membranas de los eritrocitos.

Las toxinas mutantes V122E y V126E están severamente afectadas en su actividad hemolítica. Se puede observar que usando las mismas concentraciones que con la toxina Cyt1Aa, no se logró tener el 100% de hemólisis (Figura 12). La mutante V126E logra hemolizar alrededor del 30 % de los eritrocitos de conejo en la máxima dosis analizada (1000 ng/ml) y la mutante V122E no hemoliza más allá del 5 % en esa misma concentración de toxina.

6.8 Bioensayos con larvas de cuarto instar de *Aedes aegypti*

Para hacer los bioensayos se utilizaron larvas de *A. aegypti* de cuarto instar. Los bioensayos se hicieron probando diferentes concentraciones de Sp-C, de las mutantes que forman cristales estables (Figura 8.A).

Se hizo una curva con diferentes dosis de Sp-C para obtener la LC_{50} de la toxina Cyt1Aa silvestre, al igual que de las toxinas mutantes y la toxina Cry11Aa (Sección 5.16 de Materiales y Métodos). De esta curva, se pudo determinar que la toxina Cyt1Aa silvestre tiene una $LC_{50} = 1027.7$ (820.9-1268.9) ng/ml. Las mutantes L120K y L123K son dos y tres veces más tóxicas respectivamente, que la toxina silvestre contra larvas de mosquito, ya que la mutante L120K presenta valores de $LC_{50} = 493.4$ (402.2-621.6) ng/ml y la mutante L123K tiene una $LC_{50} = 274.7$ (206.8-365) ng/ml. En cambio, las mutantes V122E y V126E no tienen actividad insecticida contra larvas de *A. aegypti* en las concentraciones indicadas en la sección 5.16 de Materiales y Métodos, por esa razón se decidió probar la concentración de 10000 ng/ml (concentración usada solamente para analizar estas toxinas) y se

comprobó que estas mutantes no tienen actividad insecticida contra larvas de mosquito (Tabla 8). La toxina Cry11Aa presenta una $LC_{50} = 669.9$ (476.3-994).

Tabla 8. Concentración letal 50 (LC_{50}) de la toxina Cyt1Aa y las toxinas Cyt1Aa*.

Toxina	Actividad insecticida LC_{50} [ng/ml]
Cyt1Aa silvestre	1027.7 (820.9-1268.9) ^a
L120K	493.4 (402.2-621.6)
V122E	>> 10000
L123K	274.7 (206.8-365)
V126E	>> 10000

^a, 95 % límites de confianza

6.9 Evaluación del Sinergismo de las toxinas Cyt1Aa o Cyt1Aa* con la toxina Cry11Aa

Los ensayos para analizar el sinergismo se hicieron usando una sola dosis sub-letal (menor a la LC_{10}) de la toxina Cyt1Aa, la dosis fue 75 ng/ml y se escogió de manera arbitraria. Además de usar también una sola dosis de la toxina Cry11Aa, la cual fue equivalente a la $LC_{20} = 200$ ng/ml. Para evaluar el sinergismo entre cada toxina Cyt1Aa* y la toxina Cry11Aa, se hizo lo mismo que con la toxina Cyt1Aa y se empleó también, la dosis de 75 ng/ml de cada mutante. Se homogeneizó la dosis empleada entre todas las mutantes para poder hacer la comparación de los resultados obtenidos entre todas las mutantes.

Los resultados obtenidos de estos bioensayos de sinergismo son los siguientes: cuando se usó la mezcla de toxinas Cyt1Aa-Cry11Aa, la actividad insecticida fue de 90 % (± 10 %) de mortalidad (Figura 13, barra 1). El resultado obtenido al emplear esta mezcla de toxinas claramente demuestra el sinergismo entre

ellas, porque la mortalidad esperada para esta mezcla era del 20 %, si el resultado fuera sólo un efecto aditivo entre ambas toxinas.

Se analizaron también las toxinas Cyt1Aa* en combinación con la toxina Cry11Aa y el resultado fue similar al obtenido con la toxina silvestre: todas las toxinas Cyt1Aa* son capaces de sinergizar la actividad de la toxina Cry11Aa, aunque individualmente algunas toxinas no tuvieron actividad insecticida (V126E y V122E).

Los resultados obtenidos con las mutantes L120K y L123K, muestran que las mutantes se comportaron igual que la toxina silvestre, teniendo el 0 % de mortalidad cuando se usó individualmente 75 ng/ml de cada toxina Cyt1Aa* (Figura 12). Y se pudo observar el incremento (sinergismo) en la mortalidad cuando se usaron las toxinas Cyt1Aa* junto con la toxina Cry11Aa: 93 % (± 5.8 %) de mortalidad para la mezcla L120K-Cry11Aa (Figura 13, barra 2) y 90 % (± 10 %) de mortalidad para la mezcla L123K-Cry11Aa (Figura 13, barra 4).

Aunque experimentalmente se esperaba que usando 75 ng/ml de la toxina L123K se tuviera el 10 % de actividad insecticida, debido a los valores calculados estadísticamente usando un análisis de Probit, se observó que en esa dosis, la mutante L123K mató al 0 % de las larvas.

Los resultados del ensayo de sinergismo empleando las mutantes V122E y V126E son de 80 % (± 15 %) de mortalidad usando la mezcla V126E-Cry11Aa (Figura 13, barra 5) y el 60 % (± 15 %) de mortalidad usando la mezcla V122E-Cry11Aa (Figura 13, barra 3). Estos resultados resultan interesantes ya que recordemos que las toxinas V122E y V126E se probaron en concentraciones tan altas como 10000 ng/ml y no se observó actividad insecticida de manera individual.

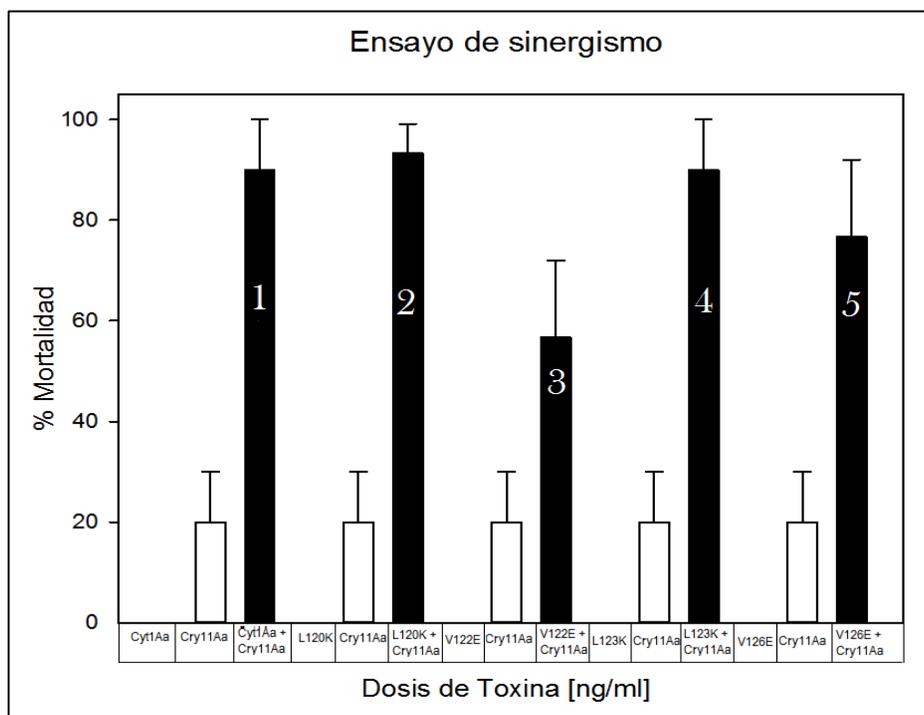


Figura 13. Bioensayo de sinergismo entre las toxinas Cyt1Aa o Cyt1Aa* y la toxina Cry11Aa. Se usó la dosis única de 75 ng/m para cada toxina Cyt1Aa o Cyt1Aa* en combinación con la dosis de 200 ng/ml de la toxina Cry11Aa. Individualmente, ninguna toxina Cyt1Aa* o Cyt1Aa es tóxica. La toxina Cry11Aa presenta el 20 % de mortalidad (barras blancas). Cuando se usa la mezcla de las toxinas Cyt1Aa* con la toxina Cry11Aa se ve sinergismo en todos los casos: la mezcla de toxina Cyt1Aa + Cry11Aa genera 90 % (barra negra 1); la mezcla de toxina L120K + Cry11Aa genera 93 % (barra negra 2); la mezcla de toxina V122E + Cry11Aa genera 60 % (barra negra 3); la mezcla de toxina L123K + Cry11Aa genera 90 % (barra negra 4); y la mezcla de toxina V126E + Cry11Aa genera 80 % (barra negra 5).

Para asignarle un valor numérico al efecto de sinergismo observado en los bioensayos, primero se calculó la Mortalidad Teórica que causaría la mezcla de dos toxinas, este cálculo se hizo con las ecuaciones reportadas por de Bravo y colaboradores (2010). En ese trabajo experimental, se reportó que es posible calcular la Mortalidad Teórica de una mezcla de toxinas que potencian su actividad entre sí (hacen sinergismo), contra larvas del mosquito *Anopheles albimanus*, aunque una de las toxinas no era tóxica contra el insecto blanco (Fernandez-Luna *et al.*, 2010). En nuestro trabajo, generamos dos mutantes (V122E y V126E) que no son tóxicas contra *A. egypti*, por esta razón, se decidió usar las mismas ecuaciones empleadas por Bravo y colaboradores (2010).

Para calcular el porcentaje de Mortalidad Teórica, primero se calcula el valor de $S_{(Toxina) OBS}$ (proporción de larvas que sobreviven a la exposición individual de toxina), que es resultado de dividir el número total de larvas que sobrevivieron en cada experimento, entre el número total de larvas usadas en todo el bioensayo. Por ejemplo, cuando se analizó a la toxina Cyt1Aa se obtuvo lo siguiente: se hicieron tres repeticiones usando 10 larvas en cada experimento y en cada experimento sobrevivieron las 10 larvas, por lo tanto, se divide 30 larvas que sobrevivieron, entre 30 larvas usadas en total, se tiene un valor de 1.0 $\underline{S_{(Cyt1Aa) OBS} = (10 + 10 + 10) / 30 = 1}$ (Tabla 9).

El valor $S_{(toxina) OBS}$ fue el mismo para todas las toxinas Cyt1Aa*, ya que al igual que la toxina silvestre, ninguna de las toxinas fue tóxica (individualmente) en la concentración empleada en este bioensayo, lo cual claramente se observa en la gráfica de la Figura 13. En cambio, cuando se calculó el valor de la toxina Cry11Aa se observa que el valor $\underline{S_{(Cry11Aa) OBS} = (7 + 9 + 8) / 30 = 0.80}$ (Tabla 9).

El siguiente valor determinado en la Tabla 9, fue $S_{(mezcla) EXP}$, el cual es el producto de la sobrevivencia observada con cada toxina de forma individual y se expresa en la siguiente fórmula:

$$S_{(Cyt1Aa + Cry11Aa) EXP} = S_{(Cyt1Aa) OBS} \times S_{(Cry11Aa) OBS} = (1.0) \times (0.8) = 0.8$$

El valor obtenido de la fórmula $\underline{S_{(Cyt1Aa + Cry11Aa) EXP} = S_{(Cyt1Aa) OBS} \times S_{(Cry11Aa) OBS}}$ nos permite calcular la **Mortalidad Teórica = $(1 - S_{(mez) EXP}) \times 100 \%$** , que en el caso de usar la mezcla de toxinas Cyt1Aa-Cry11Aa es, **Mortalidad Teórica = $(1 - 0.8) \times 100 \%$ = $(0.2) \times 100 \%$ = 20 %**.

Estos mismos cálculos se hicieron para todas las mutantes y el resultado de la Mortalidad Teórica en cada caso fue de 20 %. Este valor contrasta con el valor observado en el bioensayo, del cual se pudo obtener el valor de Mortalidad Experimental que se muestra en la última columna de la Tabla 9.

Tabla 9. Sinergismo entre las toxinas Cyt1Aa o Cyt1Aa* y la toxina Cry11A contra larvas de *Ae. aegypti* de 4to instar.

NOMBRE	$S_{(Toxina) OBS}^a =$ (Rep1+Rep2+Rep3) /n	$S_{(mez) EXP}^b =$ $S_{(Cyt1Aa)OBS} \times$ $S_{(Cry11Aa)OBS}$	Mortalidad Teórica ^c = (1- $S_{(mez) EXP}$) x 100 %	Mortalidad Experimental ^d
Cyt1Aa 75 ng/ml	1.00	0.80	20.0 %	90.00 % (±10)
L120K 75 ng/ml	1.00	0.80	20.0 %	93.20 % (±5.8)
V122E 75 ng/ml	1.00	0.80	20.0 %	60.00 % (±15)
L123K 75 ng/ml	1.00	0.80	20.0 %	90.00 % (±10)
V126E 75 ng/ml	1.00	0.80	20.0 %	80.00 % (±15)
Cry11Aa 200 ng/ml	0.80			

^a, Sobrevivencia observada con cada toxina individualmente, $S_{(toxina)OBS}$ corresponde a la proporción observada de las larvas que sobrevivieron a la exposición de una toxina. La mortalidad observada fue del 20 % con la toxina Cry11Aa en [200 ng/ml] y 0 % con Cyt1Aa a [75ng/ml]. n = 30 larvas para cada bioensayo.

^b, Proporción teórica de larvas que sobreviven a una mezcla de toxinas, $S_{(Cyt1Aa, Cry1Aa)EXP} = S_{(Cyt1Aa)OBS} \times S_{(Cry11Aa)OBS}$ corresponde a la proporción de larvas que se espera que sobrevivan a la exposición de una mezcla de toxinas.

^c, La mortalidad esperada teórica se calcula con $(1 - S_{(Cyt1Aa, Cry11Aa)EXP}) \times 100\%$

^d, Mortalidad observada experimentalmente usando la mezcla de toxinas Cry11Aa a [200 ng/ml] más cada toxina Cyt1Aa* a [75 ng/ml].

Prueba de Fisher $P < 0.001$ para cada comparación.

Los valores de sinergismo generados por las mutantes L120K y L123K son equiparables a los obtenidos con la toxina Cyt1Aa, siendo de cuatro a cinco veces más tóxica la mezcla de toxinas, que cada una individualmente (Tabla 9). Se puede apreciar en los valores obtenidos del análisis de sinergismo entre las mutantes V122E y V126E con la toxina Cry11Aa, que aun cuando de manera individual las mutantes no son tóxicas, en combinación con la toxina Cry11Aa aumenta su actividad hasta tres o cuatro veces (respectivamente) (Tabla 9). Por lo que se concluye que la toxina Cyt1Aa es capaz de sinergizar a la toxina Cry11Aa, independientemente de su actividad insecticida.

7. DISCUSION

Cyt1Aa es una toxina que se usa comercialmente para combatir al mosquito vector del dengue (*Aedes aegypti*) desde hace más de 20 años y su importancia radica en que después tanto tiempo de uso en campo, a la fecha no se han detectado mosquitos resistentes a la toxina Cyt1Aa, además, se ha observado que es capaz de potenciar la actividad insecticida de las toxinas Cry4Aa, Cry4Ba y Cry11Aa. Aunque el mecanismo por el cual Cyt1Aa ejerce su acción insecticida no se ha definido completamente y sigue en controversia, en nuestro laboratorio se ha propuesto que Cyt1Aa forma oligómeros que tienen que ver con su función insecticida y el presente trabajo, aporta datos para tratar de dilucidar dicho mecanismo.

En el presente trabajo nos planteamos la hipótesis de que la toxina Cyt1Aa forma un agregado de varios monómeros (oligómero), responsable de la función insecticida y hemolítica de la toxina Cyt1Aa, así como de la capacidad de hacer sinergismo con la toxina Cry11Aa y que a su vez, la forma oligomérica es la única capaz de insertarse en la membrana.

Para comprobar nuestra hipótesis, se decidió explorar las hélices anfipáticas α -A y α -C de la toxina Cyt1Aa y mutagenizar algunos residuos hidrofóbicos (Tabla 3) y cambiarlos por residuos con carga para afectar la capacidad de oligomerización de la toxina, basados en la idea de que el cambio de residuos hidrofóbicos por aminoácidos cargados altera las interacciones tipo Van der Waals que presentan estas hélices para mantener su estructura.

Se logró hacer la mutagénesis de todas las mutantes planeadas, sin embargo, no todas las mutantes fueron capaces de generar cristales y proteínas estables (Figura 8). De las nueve mutantes planeadas, sólo las mutantes L58E, F62R, I116, L120K, V122E, L123K y V126E generan cristales similares en forma y tamaño a la toxina silvestre. Cuando se analizaron los cultivos de las mutantes L58E, F62R e I116E con

el microscopio óptico se distinguieron algunos cristales pequeños, además, la cantidad de cristales generada es mucho menor en comparación con la toxina silvestre. Esto quedó demostrado cuando se cuantificó cada muestra, porque al analizarlas en un gel de SDS-PAGE 15 % se observó que sólo una pequeña cantidad de la proteína total analizada, corresponde a las mutantes L58E, F62R e I116E. Mayoritariamente se vieron otras bandas que podrían ser proteínas de *B. thuringiensis* producidas durante la esporulación de la bacteria o bien, fragmentos de degradación de la proteína de interés, sin embargo, no se secuenciaron dichas bandas para saber a qué proteína pertenecen.

Se continuó con el análisis de estabilidad de las toxinas mutantes y se comprobó que a pesar de detectarse cristales al microscopio en las mutantes L58E, F62R e I116E las proteínas se degradaron durante la solubilización en buffer de carbonatos a pH de 10.5 y DTT 10 mM (Figura 8.B). Estas condiciones de solubilización son semejantes a las condiciones *in vivo* presentes en el intestino de las larvas de mosquito y es un paso esencial en el mecanismo de acción de la toxina, ya que sirven para liberar la protoxina del cristal.

Al analizar las mutantes A59E y V119E mediante microscopía óptica, se observó que estas mutantes no formaron cristales, sin embargo, se empleó material colectado de estas toxinas para tratarse bajo el protocolo de solubilización y se analizó en un gel de SDS-PAGE 15 %. Con estos experimentos se pudo comprobar que la proteína que pudiera estar produciendo éstas toxinas mutantes, es sensible a las condiciones alcalinas y reductoras semejantes a las encontradas en el intestino de las larvas.

Después de comprobar la poca estabilidad que tienen las mutantes L58E, A59E, F62R, I116E y V119E, se decidió ya no trabajar con estas toxinas y sólo usar aquellas mutantes que producen cristales semejantes en tamaño y cantidad a los de la toxina Cyt1Aa silvestre: L120K, V122E, L123K y V126E, para hacerles el tratamiento con proteasas. Cabe mencionar que todas las mutantes estables se ubican

en la hélice α -C y por tanto las conclusiones de este trabajo se basan principalmente en el papel de esta hélice en el mecanismo de acción de Cyt1Aa.

En cuanto al problema de haber obtenido mutantes inestables, quizá se deba a la posición del residuo sustituido o simplemente, la sustitución es tan drástica, que afecta alguna interacción específica entre residuos. Ellar y colaboradores (1988), demostraron que una serie de residuos cargados que se sustituyeron por Alaninas, en el extremo N-terminal afectan el empaquetamiento de la toxina en el cristal, generando mutantes que no forman cristales (Ward *et al.*, 1988). A pesar de no obtener ninguna mutante estable en la región de la hélice α -A no se puede concluir que esta hélice sea responsable de la formación del cristal, ya que también generamos mutantes en la hélice α -C que no formaron cristales (mutante V119E) y que son susceptibles a condiciones alcalinas (I116E) y probablemente la producción de mutantes inestables se deba al cambio de residuos hidrofóbicos por residuos con carga.

Durante el procesamiento de la toxina, Cyt1Aa se puede cortar en diferentes sitios por distintas proteasas. Al-yahyaee y Ellar (1995) reportaron que la toxina Cyt1Aa se procesa de manera diferencial en el extremo N terminal cuando se trata con tripsina y con proteinasa K. En cambio, el procesamiento en el extremo C terminal no varía y ocurre entre los residuos Lis 225 y Phe 226. Cuando la protoxina es procesada con tripsina, genera una toxina de 23.5 kDa porque corta en el residuo V26 del extremo N terminal, en cambio, cuando se procesa con proteinasa K, genera una toxina de 22 kDa, debido a que la toxina se corta entre los residuos R30 y V31 del extremo N terminal. Ambos procesamientos generan toxinas funcionales, sin embargo, se reportó que la toxina generada con proteinasa K tiene mayor actividad hemolítica *in vitro* en eritrocitos de rata y con células de una línea celular de *Aedes aegypti* (Al-yahyaee y Ellar, 1995). Cabe destacar que esta diferencia en actividad se ve disminuida conforme se aumentan los tiempos de incubación de la toxina con las células, por lo que la diferencia de actividad no es significativa a tiempos largos de incubación en el ensayo *in vitro*.

En nuestro trabajo se decidió analizar el procesamiento de la toxina Cyt1Aa y sus mutantes usando las mismas proteasas que se han reportado en la literatura para procesar la toxina silvestre (Al-yahyaee y Ellar, 1995). Se analizó el procesamiento con tripsina y con proteinasa K de las toxinas mutantes, así como el de la toxina Cyt1Aa silvestre como control y se comprobó que el procesamiento por separado, con cada una de las proteasas, genera toxinas estables de aproximadamente 24 kDa. La aparente similitud es una observación superficial, ya que las toxinas procesadas con cada una de las proteasas no fueron secuenciadas para corroborar alguna diferencia en el procesamiento de los extremos N y C terminal de las toxinas Cyt1Aa y Cyt1Aa*.

La evidencia observada en nuestro laboratorio muestra que la toxina Cyt1Aa presenta dos dominios funcionales: el N terminal que abarca todas las hélices α que tiene la toxina y el dominio C terminal, que se compone de las estructuras β en su mayoría y cada uno de estos dominios tiene diferente actividad. Se demostró que el péptido correspondiente al dominio N terminal es capaz de inducir la oligomerización de la toxina Cyt1Aa completa, únicamente en presencia de proteinasa K, es decir, en solución. Por lo tanto se considera que el dominio N terminal es el responsable de la oligomerización de la toxina. Esta información concuerda con lo reportado por Shai y colaboradores (1997) donde se demostró que la región correspondiente a las hélices α -A y α -C son las responsables de generar la oligomerización de la toxina. Nuestro trabajo refuerza estas observaciones, ya que se demostró que mutagenizando puntualmente algunos residuos en la hélice α -C se afecta la capacidad de oligomerización de la toxina Cyt1Aa. No se exploraron las cinco hélices que presenta la toxina en su estructura, por esa razón, no se puede saber exactamente cuál región es la responsable de la oligomerización. Aunque también se mutagenizaron residuos de la hélice α -A, no se obtuvo ninguna mutante estable, por lo que no se descarta hacer más mutantes en esta hélice.

La oligomerización de las toxinas Cyt1Aa y Cyt1Aa* se analizó mediante ensayos de “western blot”, usando un anticuerpo anti-Cyt1Aa, para revelar la migración de la proteína después de hacer los ensayos de oligomerización. En estos experimentos se pudo observar que la toxina Cyt1Aa forma un agregado de alto peso molecular, que migra más arriba nuestro marcador de pesos moleculares de 250 kDa (el mayor tamaño detectado), por lo que no se pudo saber el peso exacto de dicho agregado.

En el año 1989, Gill y colaboradores determinaron, mediante separación por gradiente de sacarosa, que Cyt1Aa forma un oligómero de aproximadamente 400 kDa cuando se incuba con membranas de células de la línea celular CF1 (*Choristoneura fumiferana*) y de la línea celular AA (*Aedes albopictus*), ellos concluyeron que, suponiendo que éste agregado fuera únicamente de monómeros de Cyt1Aa, el oligómero correspondería a 16 subunidades (Chow *et al.*, 1989), aunque nunca se comprobó la composición del agregado. Debido a que este es el único trabajo experimental donde se reporta el tamaño del oligómero de Cyt1Aa y debido a que la metodología usada en este trabajo, no permitió determinar el tamaño del agregado observado, se asume que el oligómero formado por las toxinas Cyt1Aa y Cyt1Aa* podría ser también de 400 kDa. Es importante señalar, que no se analizó la actividad de formación de poro de estos agregados de alto peso molecular, dato que sería importante analizar, ya que nuestra hipótesis supone que existe un poro funcional que es capaz de insertarse en la membrana y causar desbalance osmótico en la célula.

Es evidente en nuestros experimentos, que las mutantes L120K y L123K forman oligómeros iguales al de la toxina Cyt1Aa silvestre cuando la reacción de oligomerización se hace en presencia de tripsina o proteinasa K (Figura 11.B y D). En cambio, las mutantes V122E y V126E se ven afectadas en su capacidad de oligomerización cuando se usó tripsina (Figura 11.B). Sin embargo, cuando se usó proteinasa K, sólo la mutante V122E pierde su capacidad de formar oligómeros, en cambio, la mutante V126E forma un oligómero, aunque se aprecia que es menos

estable que el de la toxina silvestre, porque éste se desestabiliza en las condiciones desnaturalizantes del gel (Figura 11.D).

Esta diferencia en la formación de oligómeros usando las diferentes proteasas, se debe quizá al corte diferencial que producen estas enzimas en la toxina Cyt1Aa, recordemos que se reportó que la actividad *in vitro* de Cyt1Aa es mayor cuando se usa proteinasa K (Al-yahyaee y Ellar, 1995). La posible formación de un oligómero de la mutante V126E, aunque menos estable que el de la toxina silvestre, concuerda también con los resultados de la actividad hemolítica de la mutante, ya que la toxina V126E mantiene alrededor del 30 % de actividad hemolítica en la máxima dosis analizada (Figura 12), por lo que se puede relacionar directamente que la formación de oligómeros es necesaria para ejercer su actividad hemolítica.

Al analizar la actividad hemolítica *in vitro* de las toxinas mutantes L120K y L123K, que sí forman oligómeros, se observó que son igualmente hemolíticas que la toxina Cyt1Aa silvestre (Figura 12). En cambio, la mutante V122E que no forma oligómeros, pierde completamente su actividad hemolítica contra eritrocitos de conejo.

Nuestros datos indican, que se requiere de un oligómero estable y funcional para que la toxina Cyt1Aa ejerza su actividad insecticida, porque debido a lo observado durante los bioensayos *in vivo* usando larvas de cuarto instar de *A. aegypti*, se demostró que las mutantes L120K y L123K mantienen su actividad insecticida (Tabla 8), en cambio, las mutantes V122E y V126E perdieron completamente su actividad insecticida (Tabla 8).

El modelo de formación de poros, sugiere que los monómeros de la toxina Cyt1Aa se insertan en la membrana y que posteriormente ocurre la oligomerización de la toxina, dentro de la membrana (Soberón *et al.*, 2013). Los datos obtenidos en este trabajo, refutan dicha hipótesis, ya que comprobó que Cyt1Aa no se inserta en la membrana en forma de monómero y únicamente las estructuras oligoméricas se

insertan en la membrana (Figuras 11.B y 11.D), lo que sugiere que la oligomerización es un paso esencial en la inserción a membrana. Un reporte previo muestra, que los monómeros de las toxinas Cyt1Aa y Cyt2Ba se mantienen asociados en la pastilla de SUV después de ultracentrifugar (Du *et al.*, 1999), sin embargo, es importante mencionar que en esos experimentos se hirvieron las muestras antes de cargarlas en un gel SDS-PAGE, una condición que desestabiliza el oligómero, por lo que los monómeros observados pueden ser producto de la degradación del oligómero.

En otro reporte, se analizó la interacción a 4 °C, de la toxina Cyt2Aa con membranas de eritrocitos, y se mostró que los monómeros de la toxina se mantienen asociados a la pastilla de membranas en esa temperatura, mientras que si se aumenta la temperatura hasta 15 ó 37 °C se observan estructuras oligoméricas (Promdonkoy y Ellar, 2003). Estos resultados sugieren, que el monómero se inserta en la membrana antes de formar los oligómeros. También es posible que la interacción de las toxinas Cyt con membranas de eritrocitos o con liposomas, sea completamente diferente. En nuestros experimentos falta por determinar, si los monómeros de las toxinas Cyt1Aa y Cyt1Aa* se insertan en las membranas de eritrocitos o simplemente se mantienen asociados debido a algún tipo de interacción específica, ya que en este trabajo no se analizó la formación de oligómeros usando membranas de los eritrocitos de conejo.

Anteriormente se reportó que la toxina Cyt1Aa es capaz de hacer sinergismo con las toxinas Cry (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa y Cry10Aa) presentes en el cristal original de la bacteria *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Wu and Federeci 1994, Pérez *et al.*, 2005, Hernández-Soto *et al.*, 2009, Cantón *et al.*, 2010). También se ha reportado que Cyt1Aa es capaz de sinergizar a las toxinas binarias BinA y BinB de la bacteria *Bacillus sphaericus*, la cual es muy efectiva para matar mosquitos de las especies *Culex* y *Anopheles*, pero no para matar *Aedes ssp.* En un reporte hecho por Wirth y colaboradores en 2000, se reportó que usando una relación 10:1 de *B. sphaericus*:Cyt1A se obtuvo 3,600 veces más de toxicidad hacia *A. aegypti* que usando *B. sphaericus* sola (Wirth *et al.*, 2000). Entonces, como puede observarse por

la evidencia ya reportada, Cyt1Aa es una toxina capaz de aumentar la actividad insecticida de otras toxinas que no presentan actividad contra el mosquito de interés o bien, aunque Cyt1Aa no sea tóxica contra el mosquito blanco, ésta toxina es capaz de potenciar la actividad de toxinas que sí son tóxicas contra ese mosquito.

Para evaluar el sinergismo de las toxinas Cyt1Aa y Cyt1Aa* en combinación con la toxina Cry11Aa, se usó el método usado por Bravo y colaboradores en 2010, dónde se tomó como base la idea de que: la actividad insecticida de una mezcla de toxinas es igual al producto de la actividad insecticida de cada una de las toxinas usadas individualmente. Ellos emplearon las toxinas Cyt1Aa, Cry11Aa y Cry4Ba en sus experimentos y comprobaron que, a pesar de que Cyt1Aa por sí sola no tiene actividad insecticida contra el mosquito *Anopheles albimanus*, en combinación con las toxinas Cry incrementaba considerablemente la actividad hacia este mosquito, por lo que se demostró que Cyt1Aa es capaz de sinergizar otras toxinas, aunque, por sí sola ésta toxina no tiene actividad (Fernández-Luna *et al.*, 2010).

En nuestro trabajo se usaron las ecuaciones empleadas por Bravo y colaboradores para analizar el sinergismo, ya que se contaba con dos mutantes que perdieron la actividad insecticida contra *A. aegypti*. Se analizó el sinergismo de todas las mutantes y de la toxina silvestre, en combinación con la toxina Cry11Aa. Los resultados demostraron que las mutantes V122E y V126E (que perdieron la actividad insecticida y no forman oligómeros), hacen sinergismo con la toxina Cry11Aa, presentando entre tres y cuatro veces más de actividad, respectivamente, que la actividad esperada (Tabla 9). Esto nos indica que no se requiere del oligómero de la toxina Cyt1Aa para que ocurra sinergismo con la toxina Cry11Aa.

En el año 2005, se reportó que Cyt1Aa podría funcionar como un receptor para la toxina Cry11Aa (Pérez *et al.*, 2005). En ese trabajo se demostró que dos regiones expuestas del C-terminal de la toxina Cyt1Aa: el asa $\beta 6$ - αE y parte del $\beta 7$, se unen a la toxina Cry11Aa. Por otro lado, la toxina Cry11Aa une a la toxina Cyt1Aa a través del asa $\alpha 8$ y $\beta 4$ del dominio II, este dominio está involucrado en la

interacción con los receptores reportados para la toxina Cry11Aa. En ese trabajo se demostró que dos mutantes de la toxina Cry11Aa localizadas en el asa $\alpha 8$, interaccionaban con la toxina Cyt1Aa, lo que afectó severamente el sinergismo (Pérez *et al.*, 2005). También se demostró que la previa unión de la toxina Cyt1Aa a membranas de hechas del intestino de *A. aegypti* (Vesículas de Membranas de la Microvellosidad Apical, BBMV's por sus siglas en inglés) aumentaba considerablemente la unión de la toxina Cry11Aa a BBM's. Todos estos datos llevaron a proponer la hipótesis de que la toxina Cyt1Aa se une a las membranas y funciona como un receptor para la toxina Cry11Aa, lo que a su vez, facilita la oligomerización de la toxina Cry11Aa en membranas del insecto blanco y hace un poro provocando la muerte del insecto.

El modelo de sinergismo propone que, obligatoriamente tiene que ocurrir la interacción entre la toxina Cyt1Aa y la toxina Cry11Aa, sin embargo, nuestros datos indican que la interacción no necesariamente ocurre una vez que Cyt1Aa se ha insertado o unido a la membrana y tal vez, podría suceder en solución. Otro punto importante en este modelo es, que se requiere que la toxina Cry11Aa sea completamente funcional, porque se propone que la interacción Cyt1Aa-Cry11Aa, favorece la formación de oligómeros de toxinas Cry capaces de matar a los mosquitos.

En nuestro trabajo, las mutaciones realizadas sobre la toxina Cyt1Aa se hicieron en la región del N-terminal, específicamente en la hélice α -C. Así que es probable, que la interacción entre las mutantes V122E y V126E con la toxina Cry11Aa siga ocurriendo, porque la región del C-terminal de Cyt1Aa, donde ocurre la interacción con la toxina Cry11Aa (Pérez *et al.*, 2005) no se afectó. Esto respondería el por qué las mutantes siguen provocando sinergismo con Cry11Aa a pesar de perder su actividad insecticida.

Sin embargo, es una posibilidad pensar, que a pesar de que sólo podría requerirse de la interacción transitoria de la toxina Cyt1Aa con la toxina Cry11Aa

para promover el sinergismo, el hecho de no encontrar a las mutantes de Cyt1Aa limitadas en una región determinada, es decir, unidas a la membranas, es menos probable que dichas toxinas lleguen a encontrarse, por lo que aunque la interacción entre estas toxinas no esté afectada, eso explicaría que las mutantes V122E y V126E tengan menor capacidad de sinergizar a la toxina Cry11Aa.

8. CONCLUSIONES

Debido a los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir que la toxina Cyt1Aa tiene actividad hemolítica e insecticida que depende de su capacidad de formar oligómeros.

También se concluye que la actividad de sinergismo, parece no depender de la formación de dicho oligómero, ya que, toxinas mutantes que no forman oligómero y no tienen actividad insecticida (V122E y V126E) son capaces de sinergizar la actividad de la toxina Cry11Aa para matar larvas de *As.aegypti*.

Finalmente, se determinó que la toxina Cyt1Aa se inserta en las membranas sintéticas en forma de oligómero y no como monómeros.

9. REFERENCIAS

1. **Al-yahyaee, S. A. S., Ellar, D. J. (1995)** Maximal toxicity of cloned cytA α -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* requires proteolytic processing from both the N and C-termini. *Microbiology* 141, 3141-3148.
2. **Butko, P., (2003)** Cytolytic toxin Cyt1Aa and its mechanism of membrane damage: Data and hypotheses. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2415–2422.
3. **Cantón, P. E., Reyes, E. Z., Escudero, I. R., Bravo, A., Soberón, M., (2010)** Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. *Peptides* 32, 595-600.
4. **Chow, E., Singh, G.J.P., Gill, S.S., (1989)** Binding and aggregation of the 25 kDa toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to cell membranes and alteration by monoclonal antibodies and amino acid modifiers. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2779-2788.
5. **Cohen, S., Cahan, R., Ben-Dov, E., Nisnevitch, M., Zaritsky, A., Firer, M.A., (2007)** Specific targeting to murine myeloma cells of Cyt1Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Biol. Chem.* 282, 28301-28308.
6. **Cohen, S., Dym, O., Albeck, S., Ben-Dov, E., Cahan, R., Firer, M., Zaritsky, A., (2008)** High resolution crystal of activated Cyt2Ba monomer from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Mol. Biol.* 380, 820–827.

7. **Cohen, S., Albeck, S., Ben-Dov, E., Cahan, R., Firer, M., Zaritsky, A., Dym, O., (2011)** Cyt1Aa toxin: crystal structure reveals implications for its membrane perforating function. *J. Mol. Biol.* 413, 804-814.
8. **Crickmore, N., Bone, E.J., Williams J.A., Ellar, D.J., (1995)** Contribution of the individual components of the δ -entotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 131, 249-254.
9. **Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., et al., (2013)** *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. [WWW document].
URL http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/.
10. **Du, J., Knowles, B.H., Li, J., Ellar, D.J., (1999)** Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic toxins in association with a phospholipid bilayer. *Biochem. J.* 338, 185-193.
11. **Duchaud, E., Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S., Bocs, S., Boursaux-Eude, C., Chandler, M., Charles, J.F., et al., (2003)** The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nat. Biotechnol.* 21(11), 1307-1313.
12. **Federici, B.A., Bauer, L.S., (1998)** Cyt1Aa protein of *Bacillus thuringiensis* is toxic to the cottonwood leaf beetle, *Chrysomela scripta*, and suppresses high levels of resistance to Cry3Aa. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4368-4371.

13. **Federici, B.A., Park, H.W., Bideshi, D.K., Wirth, M.C., Johnson, J.J., (1998)** Recombinant bacteria for mosquito control. *J. Experimental Biol.* 206, 3877-3885.
14. **Fernández-Luna, M.T., Tabaschnik, B., Lanz-Mendoza, H., Bravo, A., Soberón, 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.
15. **Gazit, E., Burshtein, N., D. J. Ellar, Sawter, T., Shai, Y., (1997)** *Bacillus thuringiensis* cytolytic toxin associates specifically with its synthetic helices A and C in the membrane bound state. Implications for assembly of oligomeric transmembrane pores. *Biochemistry* 36, 15546–15554.
16. **Hernandez-Soto, A., Del Rincón Castro, M., Espinoza, M., Ibarra, J.E., (2009)** Paraesporal body formation via overexpression of Cry10Aa toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Cry10Aa-Cyt1Aa synergism. *Applied and Environmental Microbiology* 75(14), 4661–4667.
17. **Knowles, B.H., Blatt, M.R., Tester, M., Horsnell, J. M., Carroll, J., Menestrina, G., Ellar, D.J., (1989)** A cytolytic δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* 244, 259-262.
18. **Kreitman, R.J. (2006)** Immunotoxins for targeted cancer therapy. *AAPS Journal* 8(3), E532-E551.

19. **Li, J., Pandelakis, A., Koni, Ellar, D. J. (1996)** Structure of the Mosquitocidal δ -Endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J. Mol. Biol.* 257, 129–152.

20. **Manceva, S. D., Pusztai-Carey, M., Russo, P. S., Butko, P., (2005)** A detergent-like mechanism of action of cytolytic toxin Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Biochemistry* 44: 589-597.

21. **Muñoz-Garay, C., Rodríguez-Almazán, C., Aguilar, J.N., Portugal, L., Gómez, I., Saab-Rincón, G., Soberón, M., Bravo, A., (2009)** Oligomerization of Cry11Aa from *Bacillus thuringiensis* has an important role in toxicity against *Aedes aegypti*. *Appl. Environm. Microbiol.* 75, 7548-7550.

22. **Owuama, Ch.I., (2003)** Invasion of insect blood tissue by *Xenorhabdus bovienii*. *Research in Microbiology*, 154, 183-189.

23. **Parker, M.W., Feil, S.C., (2005)** Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 88, 91–142.

24. **Pérez, C., Fernández, L.E., Sun, J., Folch, J.L., Gill, S.S., Soberón, M., Bravo, A., (2005)** *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 18303–18308.

25. **Pérez, C., Muñoz-Garay, C., Portugal, L. C., Sánchez, J., Gill, S.S., Soberón, M., Bravo, A., (2007)** *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. *Cell. Microbiol.* 9, 2931–2937.
26. **Promdonkoy, B., Ellar, D.J., (2000)** Membrane pore architecture of a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* 350, 275–282.
27. **Promdonkoy, B., Ellar, D.J., (2003)** Investigation of the pore forming mechanism of cytolytic δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* 374, 255-259.
28. **Promdonkoy, B., Rungrod, A., Promdonkoy, P., Pathaichindachote, W., Krittanai, Ch., Panyim, S., (2008)** Amino acid substitutions in α -A and α -C of Cyt2Aa2 alter hemolytic activity and mosquitolarvicidal specificity. *J. Biotechnol.* 133, 287–293.
29. **Quevillon-Cheruel, S., Leulliot, N., Acosta-Muniz, C., Vincent, M., Gallay, J., Argentini, M., Cornu, D., Bocard, F., Lemaitre, B., van Tilbeurgh, H., (2009)** Evf, a virulent factor produced by the *Drosophila* pathogen *Erwinia carotova*, is an S-palmitoylated protein with a new fold that binds to lipid vesicles. *J. Biol. Chem.* 284, 3552-3561.
30. **Rodriguez-Almazán, C., Ruiz de Escudero, I., Cantón, P., Muñoz-Garay, C., Pérez, C., Gill S. S., Soberón, M., Bravo, A., (2011)** The amino- and carboxyl terminal fragments of the *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa toxin have differential roles in toxin oligomerization and pore formation. *Biochemistry* 50, 388-396.

31. **Rupar, M.J., Donovan, W.P., Tan, Y., Slaney, A.C., (2000)** *Bacillus thuringiensis* CryET29 Composition toxic to coleopteran insects and *Ctenocephalides spp.* USA Patent 6093695.
32. **Said, A.S., Al-yahyaee, S., Ellar, D.J., (1996)** Cell targeting of a pore forming toxin, CytA d-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, by conjugating CytA with anti-Thy 1 monoclonal antibodies and insulina. *Bioconjugate Chem.* 7, 451-460.
33. **Soberón, M., López-Díaz, J.A., Bravo, A., (2013)** Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides* 41, 87-93.
34. **Thomas, W.E., Ellar, D.J., (1983a)** *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell Sci.* 60, 181-197.
35. **Thomas, W.E., Ellar, D.J., (1983b)** Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* insecticidal δ -endotoxin. *Letters* 154,362-368.
36. **Wirth, M.C., Georghiou, G.P., Federici, B.A., (1997)** CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 10536–10540.
37. **Wirth, C.M., Federici, B.A., Walton, W.E., (2000)** Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* synergizes activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti*. (Diptera:Culicidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1093-1097.

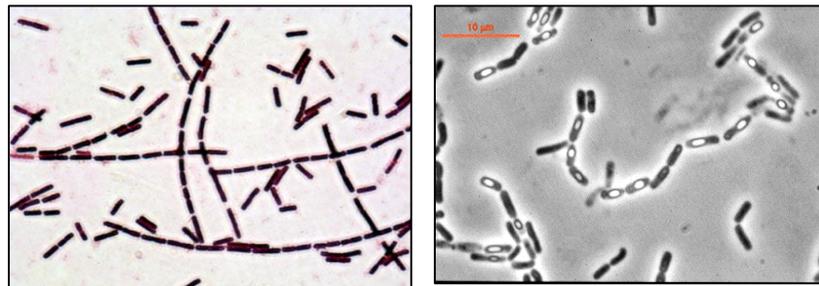
38. **Wirth, M.C., Park, H-W., Walton, W.E., Federici, B.A., (2005)** Cyt of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 185-189.

39. **Weng, Y.-P., Lin, Y.-P., Hsu, Ch-I., Lin, J.-Y., (2004)** Functional domains of a pore-forming cardiotoxic protein Volvatoxin A2. *J. Biol. Chem.* 279, 6805–6814.

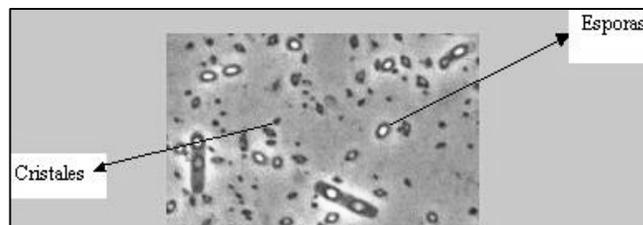
40. **Wu, D., Johnson, J.J., Federeci, B.A., (1994)** Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIV proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Mol. Microbiol.* 13, 965–972.

ANEXO 1

Cultivo celular de la cepa *B. thuringiensis* visto en el microscopio óptico.



Fase vegetativa

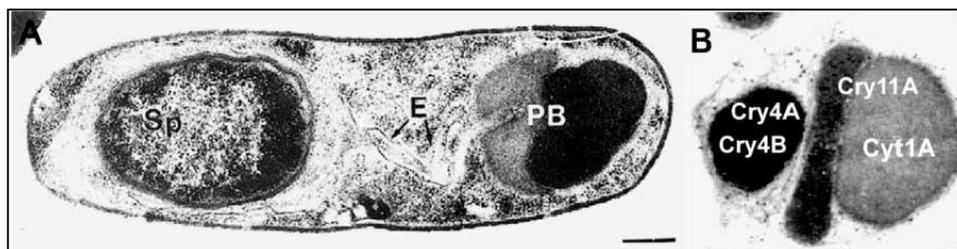


Fase de esporulación

Micrografías tomadas de las páginas de internet:

- <httppeople.uleth.ca/~selib1Bio13200Morphology04Exer304.html>
- <httptextbookofbacteriology.net/Anthrax.htm>
- <httpwww.monografias.com/trabajos69/insecticidas-biologicos-control/insecticidas-biologicos-control2.shtml>

Tomado de Federeci *et al.*, (1998). Cristal de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* tomado con un microscopio de transmisión de electrones.



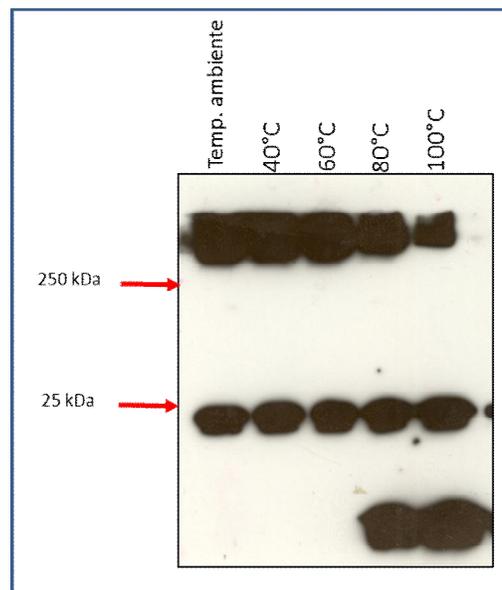
Sp: Espora, **E:** exoespora, **PB:** cuerpo paraesporal que contiene las toxinas Cyt1Aa, Cry4Aa, Cry4Ba y Cry11Aa. La barra indica 1 µm.

ANEXO 2

Tabla de las tres repeticiones de los Bioensayos hechos con larvas de cuarto instar de *A. aegypti*.

TOXINA	BIOENSAYO 1	BIOENSAYO 2	BIOENSAYO 3	PROMEDIO
Cyt1Aa	1103.9 (880.4-1484.8)	908.1 (741.7-1181.2)	1068.2 (840.6-1140.6)	1027.7 (820.9-1268.9)
L120K	471.1 (387.8-577.4)	498.1 (393.6-670.7)	511.1 (425.1-616.8)	493.4 (402.2-621.6)
L123K	381.2 (273.8-508.5)	228.6 (176.6-307)	214.3 (170.1-279.4)	274.7 (206.8-365)
Cry11Aa	649.9 (463.3-925.6)	589.3 (402.8-817.6)	770.7 (563-1238.9)	669.9 (476.3-994)

ANEXO 3



Análisis de la oligomerización de la toxina Cyt1Aa, después de la incubación durante 1 hora a 37 °C de 200 ng de protoxina soluble en presencia de SUV y proteinasa K 1:10. Las muestras sin centrifugar, se calentaron durante 3 minutos a diferentes temperaturas antes de cargarlas en un gel SDS-PAGE al 15 %, para ser analizadas posteriormente por “western-blot” usando un anticuerpo anti-Cyt1Aa. Este resultado nos permitió escoger la temperatura de 65 °C a la cual se hicieron todos los experimentos de oligomerización, ya que como se puede observar, si las muestras son calentadas a altas temperaturas, el oligómero comienza a desestabilizarse.