



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Papel de las hélices  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 en la especificidad de la toxina Cyt1Aa de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Paulina Anaya Cárdenas

Dr. Mario Soberón Chávez  
Instituto de Biotecnología

Dr. Humberto Lanz Mendoza  
Instituto Nacional de Salud Pública

Dr. Takuya Nishigaki Shimizu  
Instituto de Biotecnología

Cuernavaca, Morelos. 2019



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.

# CONTENIDO

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
<i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> .....	9
<i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> SUBSP. <i>ISRAELENSIS</i> .....	11
NOMENCLATURA DE LAS TOXINAS .....	12
TOXINAS CRY DE 3 DOMINIOS .....	12
ESTRUCTURA DE LAS TOXINAS CRY .....	14
TOXINAS CYT .....	16
ESTRUCTURA DE LAS TOXINAS CYT .....	18
MECANISMO DE ACCIÓN .....	19
INTERACCIÓN CON LÍPIDOS .....	22
CARACTERÍSTICAS DE LAS TOXINAS CYT .....	24
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>27</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>30</b>
<b>OBJETIVO</b> .....	<b>30</b>
<b>METAS PARTICULARES</b> .....	<b>30</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>31</b>
CEPAS UTILIZADAS .....	31
MEDIOS DE CULTIVO .....	32
MUTAGÉNESIS .....	33
PURIFICACIÓN DE PRODUCTO DE PCR .....	35
CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> DH5A .....	36
CÉLULAS QUIMICOMPETENTES DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> SCS110 .....	36
CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES DE BT 407- (ACRISTALÍFERA) .....	36
PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO EN PEQUEÑA ESCALA (MINI-PREPARACIONES) .....	37
COMPROBACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DE <i>CYT1AA</i> .....	37
SECUENCIACIÓN .....	38
TRANSFORMACIÓN EN CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES DE <i>E. COLI</i> DH5A .....	38
TRANSFORMACIÓN EN CÉLULAS QUIMICOMPETENTES DE <i>E. COLI</i> SCS110 .....	39
TRANSFORMACIÓN EN CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES DE <i>B. 407-</i> (ACRISTALÍFERA) .....	39
PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE CRISTALES PROTEICOS (SOLUCIÓN ESPORA-CRISTAL) .....	40
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS .....	40
SOLUBILIZACIÓN Y ACTIVACIÓN DE TOXINAS .....	40
BIOENSAYOS .....	41
A. <i>Larvas del mosquito A. aegypti</i> .....	41
B. <i>Larvas de lepidóptero Manduca sexta</i> .....	42
ENSAYOS DE HEMÓLISIS .....	42
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN CUALITATIVA WESTERN BLOT .....	43

MARCAJE DE TOXINAS CON BIOTINA.....	44
DETECCIÓN DE TOXINAS BIOTINILADAS.....	44
PREPARACIÓN DE BBMVs.....	45
ENSAYOS DE UNIÓN CUALITATIVA CON ERITROCITOS DE CONEJO Y BBMVs DE LARVAS DE <i>A. AEGYPTI</i> .....	46
OLIGOMERIZACIÓN EN BBMVs DE LARVAS DEL MOSQUITO <i>A. AEGYPTI</i> .....	47
ENSAYOS DE UNIÓN A LÍPIDOS DE MEMBRANA (MEMBRANE LIPID STRIPS).....	49
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
MUTAGÉNESIS DIRIGIDA .....	50
ENSAYOS DE SOLUBILIZACIÓN Y ACTIVACIÓN DE TOXINAS .....	53
ACTIVIDAD TÓXICA EN LARVAS DE MOSQUITO <i>A. AEGYPTI</i> Y <i>M. SEXTA</i> .....	56
ACTIVIDAD HEMOLÍTICA EN ERITROCITOS DE CONEJO .....	59
CARACTERIZACIÓN DE TOXINAS AFECTADAS EN TOXICIDAD .....	61
<i>Ensayos de unión</i> .....	62
I. <i>Marcaje de toxinas activadas con biotina</i> .....	62
II. <i>Ensayo de unión a eritrocitos</i> .....	63
III. <i>Ensayo de unión a BBMVs del intestino de larvas de A. aegypti</i> .....	64
IV. <i>Oligomerización en BBMVs de larvas de A. aegypti</i> .....	66
V. <i>Lipid dot blot</i> .....	67
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>72</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>80</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>89</b>

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Mario Soberón Chávez con el financiamiento de la beca Conacyt 817539 y el apoyo de DGAPA donativo IN-202718.

## ABSTRACT

*Bacillus thuringiensis subsp israelensis* (Bt) Cyt1Aa toxin is a single  $\alpha$ - $\beta$  domain pore forming toxin, where the  $\beta$  sheets are wrapped by two  $\alpha$ -helices hairpins, that shows cytotoxicity to mosquitoes, to certain coleopteran pests and to other type of cells including red blood cells (RBC). However, its mode of action in the different target cells is not well defined. The Cyt1Aa  $\alpha$ -helix hairpin in the N-terminal has been proposed to be involved in initial membrane binding and oligomerization, while the  $\beta$  sheets insert into the membrane to form the pore that kill the insect gut cells.

Here we characterized different single point mutations in N-terminal Cyt1Aa  $\alpha$ -helix hairpin, formed by helices  $\alpha$ -1 and  $\alpha$ -2, to determine the role of this toxin region in its mode of action. From ten cysteine substitutions in different residues that could be produced in *Bt*, three Cyt1A mutants, Cyt1AaA65C, Cyt1AaL85C and Cyt1AaN89C lost insecticidal toxicity against *A. aegypti* larvae but retained similar or increased hemolytic activity in rabbit RBC. On the contrary, two Cyt1Aa mutants Cyt1AaA88C and Cyt1AaA59C showed the opposite phenotype, losing their hemolytic activity in rabbit RBC but retained their toxicity against *A. aegypti* larvae. Analysis of binding and oligomerization with *A. aegypti* brush border membrane vesicles showed that the three Cyt1Aa non-toxic mutants to *A. aegypti* were able to bind to the *A. aegypti* brush border membrane vesicles but were affected in oligomerization. All these variants showed no binding to membrane lipids strips.

Our data shows that oligomerization of Cyt1Aa toxin is essential for its toxicity to *A. aegypti* and that both types of toxicities, insecticidal and hemolytic activities, may be separated by point mutations in both helices, indicating that the mode of action of Cyt1Aa is dissimilar in these different target membranes.

## RESUMEN

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria gran positiva que produce estructuras paraesporales cristalinas que están compuestas por proteínas insecticidas. Estas proteínas son conocidas como toxinas Cry y Cyt que forman parte del grupo de toxinas formadoras de poro que presentan toxicidad hacia diversos órdenes de insectos. Las toxinas Cry tienen toxicidad contra coleópteros, lepidópteros y dípteros. Por el contrario, las toxinas Cyt presentan toxicidad específica hacia dípteros entre ellos mosquitos y moscas.

*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* produce cuatro proteínas Cry de 3 dominios, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa y Cry11Aa, junto con dos toxinas Cyt, Cyt1Aa y Cyt2Ba. *Bti* se ha utilizado en todo el mundo para el biocontrol de diferentes especies de moscas y mosquitos, que son vectores de diversas enfermedades humanas.

El modo de acción de las toxinas Cyt comienza con la ingesta de los cristales proteicos por la larva del insecto blanco, los cuales son solubilizados por el jugo gástrico del insecto susceptible, y posteriormente activado por proteasas intestinales. Las toxinas activadas sufren cambios conformacionales que le permiten insertarse en la membrana de las células del intestino, induciendo la lisis celular y la posterior muerte de la larva. A diferencia de las toxinas Cry que reconocen proteínas en la membrana, las toxinas Cyt se unen directamente a lípidos de membrana.

La toxina Cyt1Aa está compuesta por un solo dominio  $\alpha$ - $\beta$ , donde las láminas  $\beta$  están envueltas por dos horquillas compuestas por hélices  $\alpha$ . Se ha propuesto que la horquilla de hélices  $\alpha$  del amino terminal de la toxina Cyt1A está involucrada en la unión a la membrana y en la oligomerización de la toxina, mientras que las láminas  $\beta$  son las que se insertan en la membrana para la formación del poro lítico que induce la muerte de la larva.

Esta toxina es tóxica contra mosquitos, entre ellos el vector de diversas enfermedades, *Aedes aegypti*. Además de la toxicidad hacia mosquitos, Cyt1Aa tiene citotoxicidad hacia diferentes tipos celulares entre ellos eritrocitos, linfocitos y fibroblastos, sin embargo, el mecanismo de acción en cada uno de ellos aún se desconoce.

Trabajos previos de mutagénesis dirigida en la toxina Cyt1Aa habían demostrado que mutaciones puntuales en la hélice  $\alpha$ -1 permitían separar la actividad tóxica a larvas y hemolítica de la toxina, estableciendo el papel

de la hélice  $\alpha$ -1 en el reconocimiento diferencial entre el tipo celular blanco de la toxina, y por consiguiente en su especificidad.

En el presente trabajo se caracterizó mutantes puntuales en la hélice  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 de la toxina Cyt1Aa para determinar el papel de esta región en el mecanismo de acción de esta toxina. Las variantes de Cyt1Aa A88C y A59C mostraron una afectación negativa en su actividad hemolítica en eritrocitos de conejo, preservando su actividad tóxica contra larvas de *A. aegypti*. Por el contrario, las variantes de Cyt1Aa A65C, L85C y N89C mostraron una afectación negativa en su actividad tóxica contra larvas de *A. aegypti*, preservando su actividad hemolítica en eritrocitos de conejo. Las variantes no tóxicas a *A. aegypti* fueron capaces de unirse a BBMV de larvas de *A. aegypti* aunque fueron incapaces de formar oligómeros en BBMV lo que explica la pérdida de toxicidad a larvas de *A. aegypti*. Las variantes de Cyt1Aa no hemolíticas y las variantes no tóxicas a larvas de *A. aegypti*, así como la misma toxina Cyt1Aa silvestre fueron incapaces de interactuar con lípidos de membrana acoplados individualmente, proponiendo que la interacción de esta toxina con la membrana depende de otras características de los lípidos que la conforman y del contexto de éstos.

Los resultados obtenidos demuestran que la oligomerización es esencial para la toxicidad a larvas de *A. aegypti*, y que ambas toxicidades, la actividad hemolítica y tóxica a larvas de *A. aegypti* de la toxina Cyt1Aa se pueden separar por mutaciones puntuales en la hélice  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2, indicando un mecanismo de acción diferente en las membranas blanco de esta toxina.



## INTRODUCCIÓN

Los mosquitos del orden Díptera son vectores de varias enfermedades causadas por bacterias, virus y parásitos que transmiten estas enfermedades a través de una picadura en el hospedero.

Se estima que cada año 700 millones de personas contraen alguna de estas enfermedades, de las cuales más de un millón de personas muere a causa de ello (Mosquito.org, 2018)

Entre las enfermedades transmitidas por mosquitos se encuentran la malaria y filariasis transmitidas por mosquitos del género *Anopheles*; el dengue, el chikungunya, la fiebre del zika y la fiebre amarilla transmitidas por mosquitos del género *Aedes*; y la enfermedad del virus del Nilo Occidental, la encefalitis japonesa y la filariasis, transmitidas por mosquitos del género *Culex*. La mayoría de estas enfermedades aún no pueden ser tratadas o prevenidas con vacunas por lo que existe un alto riesgo de contagio (Lee et al., 2018; Tolle, 2009).

Tan solo en el año 2018 se registraron 700,000 muertes a causa de las enfermedades transmitidas por mosquitos en todo el mundo. Se sabe que más de un millón de personas alrededor del mundo muere a causa de una enfermedad transmitida por mosquitos al año, registrándose entre 300 y 500 millones de casos nuevos al año. Debido a que más de la mitad de la población del mundo vive en áreas donde se encuentran estas especies de mosquitos, se han incentivado esfuerzos para controlar las poblaciones de estas especies de mosquitos empleando diferentes estrategias. (Mosquito.org, 2018).

El control de estos vectores se ha abordado inicialmente con el uso de insecticidas químicos generales, aunque en los últimos años se les ha asociado a riesgos a la salud humana y animal debido a su baja especificidad y alta permanencia en suelos y cuerpos de agua, lo que aumenta los riesgos a la salud por la exposición prolongada a éstos, y afectando también a otros organismos de importancia ecológica.

Por otro lado, la resistencia a estos insecticidas químicos lleva más de 25 años presente en África, América y Europa, y se debe en su mayoría a la pérdida de sensibilidad de la esterasa de acetilcolina de estos mosquitos a los organofosfatos y carbamatos que componen a varios insecticidas químicos (Liu, 2015).

Una de las estrategias con mayor interés actualmente es la del control biológico o biocontrol que son estrategias que permiten mitigar o disminuir organismo que causan enfermedades, como lo son los mosquitos, a través del uso de organismos que controlan las poblaciones de estos vectores.

Una de estas alternativas es el uso de bacterias entomopatógenicas siendo *Bacillus thuringiensis* las más importante y estudiada, ya que sintetiza proteínas insecticidas que atacan organismos de interés comercial y de salud.

### ***Bacillus thuringiensis***

*Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria Gram positiva y aerobia estricta, con una distribución muy ubicua en diferentes nichos ecológicos, desde la tierra, en la superficie de plantas, en el polvo, en cadáveres de insectos, en suelos agrícolas, en granos, e incluso en ambientes acuáticos siendo así considerado como un patógeno cosmopolita (Bel *et al.*, 1997; Ben-Dov *et al.*, 1997; Bravo *et al.*, 1998; Dai *et al.*, 2008; De Maagd *et al.*, 2001; Iriarte *et al.*, 1998; Martin & Travers, 1989; Meadows *et al.*, 1992; Mizuki *et al.*, 1999; Sadler *et al.*, 2006; Shishir *et al.*, 2012, 2014; Theunis *et al.*, 1998; Xavier *et al.*, 2017).

*B. thuringiensis* presenta dos fases de crecimiento: una fase vegetativa en donde se divide por bipartición, y una fase de esporulación, que se induce por señales internas y externas que responden a la falta de nutrientes, la densidad celular y la progresión del ciclo celular (Piggot & Hilbert, 2004). Esta etapa de esporulación da lugar a la formación de esporas dormantes resistentes a condiciones de estrés como calor y sustancias químicas nocivas.

La esporulación de *B. thuringiensis* se divide en 4 principales fases: la fase I de crecimiento vegetativo, la fase II de transición a esporulación, la fase III de esporulación y la fase IV de maduración de espora y lisis celular (Berbert-Molina *et al.*, 2008; Piggot & Hilbert, 2004).

Durante la fase de esporulación además del proceso de formación de esporas, se producen cuerpos cristalinos paraesporales compuestos de  $\delta$ -endotoxinas insecticidas (ver figura 1).

La síntesis de las toxinas insecticidas es un proceso altamente regulado que ocurre durante la fase de esporulación, donde se producen tanto las esporas como los cristales paraesporales, ambos procesos controlados por factores de transcripción asociados a la esporulación (Agaisse & Lereclus, 1995; Deng *et al.*, 2014; Guidelli-thuler *et al.*, 2009; Pérez-García *et al.*, 2010; Sedlak *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2013). La síntesis de estas toxinas le otorga la ventaja a *B. thuringiensis* de dañar la membrana del intestino de las larvas de los insectos blanco, colonizar el hemocele, desencadenando una rápida septicemia y la muerte de la larva (Caccia *et al.*, 2016).

Hasta el momento, se han aislado y clasificado 50,000 cepas de *B. thuringiensis*, de las cuales se han identificado 71 serotipos con base en reacciones inmunológicas del flagelo, identificado 300 holotipos de toxinas que se han categorizado en 73 familias de toxinas Cry y 3 familias de toxinas Cyt (Schnepf et al., 1998).

Se han identificado varias subespecies que matan un cierto orden de insectos, pero que, en conjunto, abarcan varios de los órdenes de insectos como Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Ortoptera y Mallophoga, e incluso otros organismos como nematodos, ácaros y protozoarios, así como a algunas líneas celulares de cáncer (Feitelson et al., 1992).

Además de las toxinas Cry y Cyt, *B. thuringiensis* también sintetiza otro tipo de toxinas que se producen durante la fase vegetativa de crecimiento llamadas las proteínas insecticidas vegetativas (Vip) y las proteínas insecticidas secretadas (Sip). Las toxinas Vip están clasificadas en 4 familias de acuerdo con su identidad de secuencia. La toxina binaria que incluye a la Vip1 y Vip2 y la toxina Sip son tóxicas contra coleópteros mientras que las toxinas Vip3 son tóxicas contra lepidópteros (Chakroun et al., 2016; Donovan et al., 2006; Estruch et al., 1996).

Una de las características distintivas de *B. thuringiensis* con respecto a otras especies del grupo de *Bacillus*, es la síntesis de estas toxinas insecticidas, diferenciándose principalmente con las bacterias *B. cereus*, un patógeno oportunista de humanos, y con *B. anthracis*, el agente causal del carbunco, con quién existe gran cercanía filogenética (Rasko et al., 2005). Las diferencias entre estas especies radican a nivel plasmídico, en donde *B. thuringiensis* presenta plásmidos de gran tamaño con diferentes genes que codifican para las toxinas insecticidas mientras que *B. cereus* no los presenta. A su vez, *B. anthracis* presenta dos plásmidos pX01- y pX02 que contienen los genes que codifican para los componentes de la toxina del ántrax, reguladores adicionales y elementos de inserción que la diferencian de las otras especies (Fouet & Mock, 2006; Helgason et al., 2000; Okinaka et al., 1999).

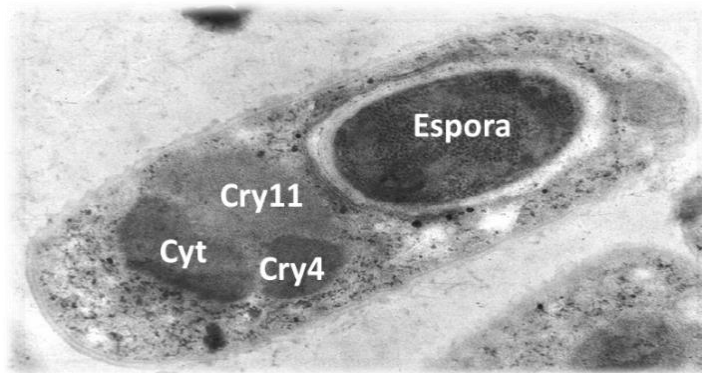
*B. thuringiensis* no solo sintetiza toxinas insecticidas, sino que presenta un gran arsenal de otros factores de virulencia como fosfolipasas C, proteasas, quitinasas, queratinasas, metaloproteasas y hemolisinas (Brar et al., 2009; Gominet et al., 2001; Grandvalet et al., 2001; Hajaij-Ellouze et al., 2006; Martin et al., 2010; Palvannan & Boopathy, 2005).

### *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) es una subespecie del género *Bacillus* que ha sido estudiada por su uso en el biocontrol de dípteros como moscas y mosquitos, entre ellos los vectores de enfermedades *Aedes* y *Culex*. *Bti* es considerada la alternativa más poderosa y ecológica para el control de estos vectores.

Entre las toxinas que produce *Bti* se encuentran las toxinas Cry de 3 dominios, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa y Cry11Aa, así como otro tipo de toxinas, las toxinas Cyt, Cyt1Aa, Cyt2Ba y Cyt1Ca, todas ellas tóxicas contra dípteros (ver figura 1) (Bravo et al., 2011; Crickmore et al., 1995; Ibarra & Federici, 1986). Los genes que codifican para estas toxinas se encuentran en un plásmido de gran tamaño llamado pBtoxis (Berry et al., 2002).

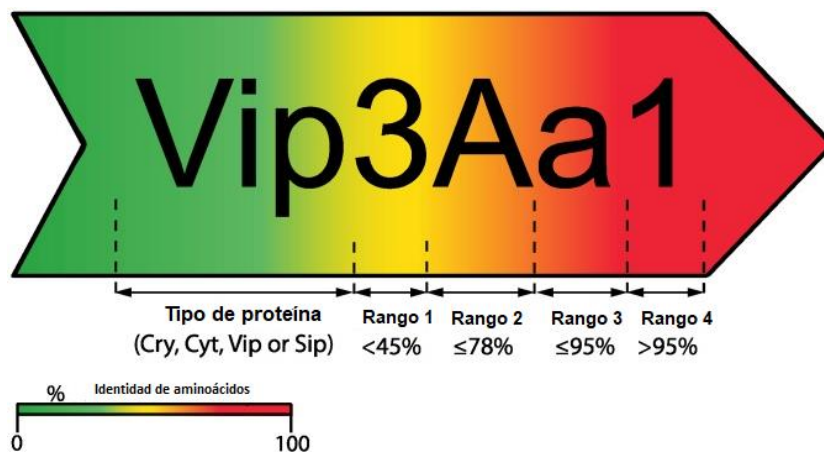
*Bti* no solo es tóxica contra moscas y mosquitos, sino que tiene un campo de toxicidad aún más amplio, que incluye a varias especies de interés comercial, entre ellas el áfido de la papa - *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera), el gorgojo del algodón - *Anthonomus grandis* (Coleoptera), el escarabajo de la hoja del álamo - *Chrysomela scripta* (Coleoptera), el cogollero del maíz - *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera), la palomilla dorso de diamante, conocida también como polilla de la col o polilla del repollo - *Plutella xylostella* (Lepidoptera), el nematodo del nudo de la raíz - *Meloidogyne incognita* (Nematoda), entre otras (Donovan et al., 2006; Federici i & Bauer, 1998; Jain et al., 2008; Monnerat et al., 2012; Porcar et al., 2009; Sayyed et al., 2001; Sharma, 1994; Walters et al., 1995).



**Figura 1.** *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Célula de *Bti* en fase de esporulación donde se observa con una espora y cristales paraesporales compuestos de las toxinas Cry11, Cyt y Cry4.

## Nomenclatura de las toxinas

La nomenclatura de las toxinas producidas por *B. thuringiensis* se basa en su identidad, en donde aquellas toxinas que presentan menos del 45% de identidad se nombran con un número arábigo (ej. Cry1 y Cry2), si éstas presentan menos del 78% de identidad se nombran con una letra mayúscula (ej. Cry1A y Cry2B), si entre 2 toxinas presentan menos del 95% de identidad se nombran con una letra minúscula (ej. Cyt1Aa y Cyt2Ba), y finalmente aquellas toxinas que presentan más del 95% de identidad se diferencian de nuevo con un número arábigo al final del nombre de la toxina en cuestión (ej. Vip3Aa1 y Vip3Aa2) (ver figura 2) (Crickmore et al. 2011).

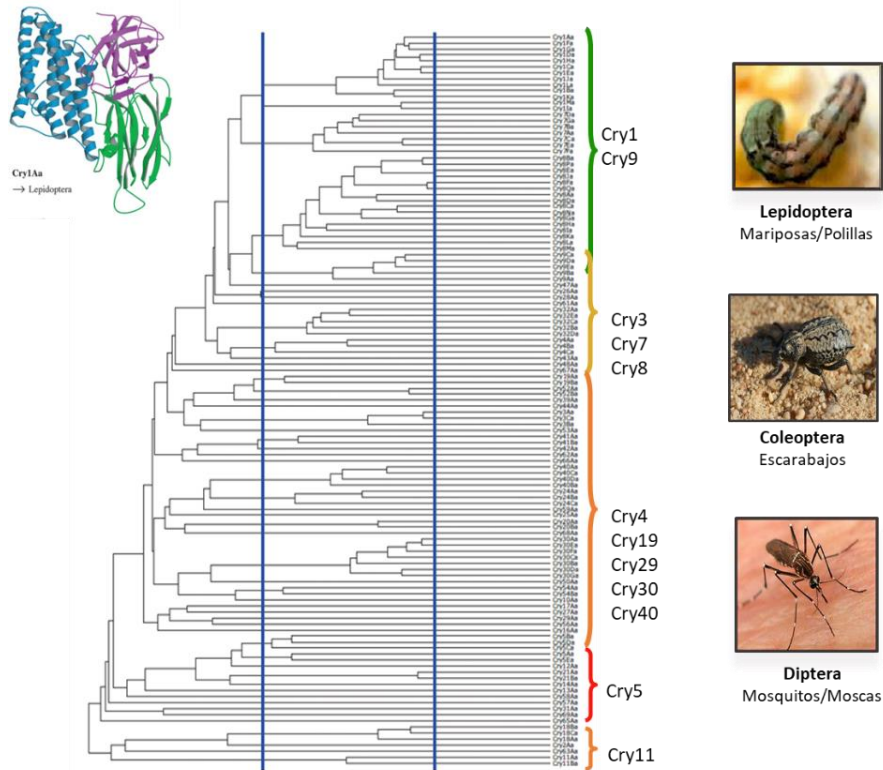


**Figura 2. Nomenclatura de las toxinas de *B. thuringiensis*.** En colores se denota la diversidad de la identidad de aminoácidos entre las proteínas producidas por *B. thuringiensis* así como la clasificación de su nomenclatura con base en la identidad entre ellas.

## Toxinas Cry de 3 Dominios

Las toxinas Cry de tres dominios son el grupo más grande de toxinas Cry (3d-Cry), llamadas así debido a que en su forma activa están conformadas por 3 dominios, las cuales se clasifican en 5 familias y 75 grupos. Estas toxinas producidas por varias subespecies de *Bacillus thuringiensis*, han sido empleadas como bioinsecticidas contra diferentes órdenes de insectos entre ellos Lepidoptera (mariposas y polillas), Coleoptera (ecarabajos),

Diptera (moscas y mosquitos), Hemiptera (pulgones, cigarras, entre otros) y nemátodos, que son plagas de cultivos de interés comercial (ver figura 3 y 4) (Palma et al., 2014).

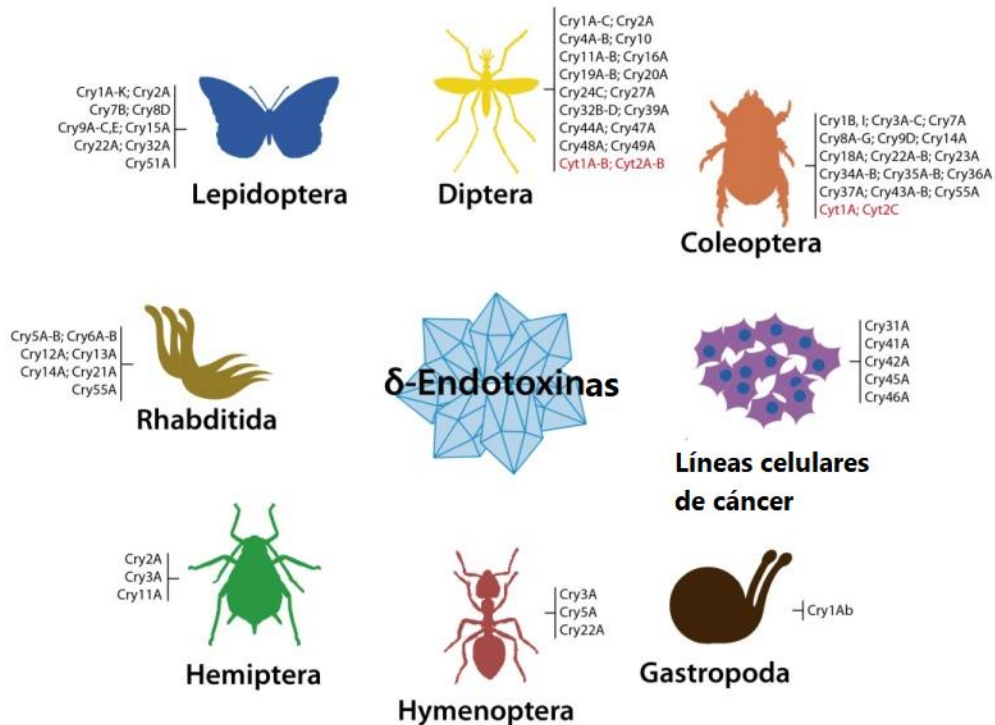


**Figura 3. Árbol filogenético de las toxinas Cry de 3 dominios de *B. thuringiensis*.** De lado izquierdo se muestra la estructura tridimensional de la toxina Cry de 3 dominios Cry1Aa. En el centro se muestra la filogenia de las toxinas Cry de 3 dominios. De lado derecho se muestran algunas de las familias de organismos blanco de este tipo de toxinas (Coleópteros, Lepidópteros y Dípteros)

Además de las toxinas con actividad insecticida, *B. thuringiensis* también produce otro tipo de toxinas Cry que no tienen efecto insecticida, pero sí citotóxico contra otro tipo celular, las cuales reciben el nombre de parasporinas. Entre estas toxinas se encuentran Cry31A, Cry41A, Cry45A, Cry46A, Cry63A y Cry64A que son citotóxicas contra células cancerosas de origen diverso, por lo que reciben el nombre de parasporina-1 (PS1), parasporina-3 (PS3), parasporina-4 (PS4), parasporina-2 (PS2), parasporina-6 (PS6) y parasporina-5 (PS5) respectivamente (ver figura 4) (Palma et al., 2014).

Algunas cepas de *B. thuringiensis* sintetizan otro tipo de toxinas llamadas proteínas Cry tipo Bin y proteínas de la familia ETX\_MTX2, que reciben este nombre por su similitud con las toxinas binarias (Bin) producidas por *B. sphaericus* y las toxinas Mtx2 producidas por *Lysinibacillus sphaericus* contra mosquitos (Palma et al., 2014).

La información anterior denota el amplio espectro de toxicidad de las endotoxinas sintetizadas por *B. thuringiensis* hacia diferentes tipos de células principalmente hacia el estadio larvario de varias familias de insectos pero también hacia algunos tipos celulares de mamíferos.



**Figura 4. Espectro de organismos blanco de las toxinas producidas por *B. thuringiensis*.** En negro se encuentran las toxinas Cry y en rojo las toxinas Cyt. Palma *et al.*, 2014.

### Estructura de las toxinas Cry

Las toxinas Cry de tres dominios (3d-Cry) han sido el tipo de  $\delta$ -endotoxinas más estudiados. Hasta el momento se ha elucidado la estructura cristalográfica de al menos 9 toxinas 3-dCry entre ellas las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry3Bb, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry5B y Cry8Ea1, observando que éstas

muestran una misma topología, a pesar de las diferencias en especificidad e identidad de secuencia (ver figura 5) (Adang et al., 2016; Boonserm et al., 2005; 2006; Bravo et al., 2011; De Maagd et al., 2003; Galitsky et al., 2001; Grochulski et al., 1995; Guo et al., 2009; Hui et al., 2012; Ibrahim et al., 2010; Jha et al., 2010; Li et al., 1991; Morse et al., 2001; Sanahuja et al., 2011; Sturman et al., 2014).

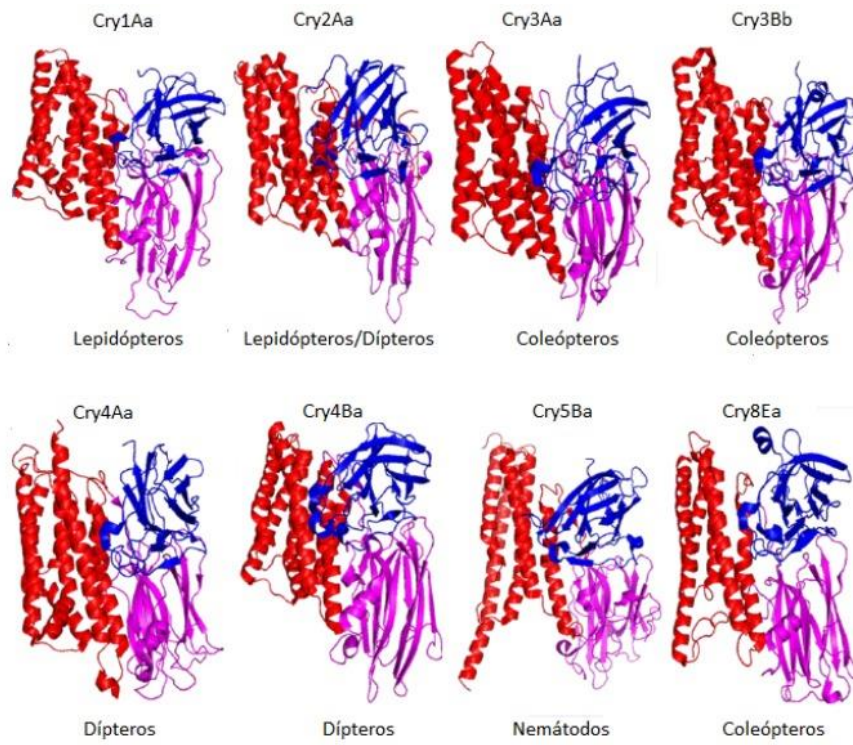
En su forma activa, las toxinas 3D- Cry están conformadas por 3 dominios, cada uno con una función importante para el mecanismo de acción de este tipo de toxinas.

El dominio I está conformado por un ramillete de 7 hélices alfa, en el cual 6 de estas hélices rodean a la hélice alfa 5 hidrofóbica. Este dominio presenta una estructura similar al dominio de formación de poro de otras toxinas bacterianas como la difteria y la colicina A (Boonserm et al., 2006; Bravo et al., 2007). Se ha propuesto por ensayos de mutagénesis dirigida, que esta región está involucrada en la oligomerización, inserción a la membrana y la formación del poro (Cantón et al., 2011; Jiménez-Juárez et al., 2007)

El dominio II está compuesto por once láminas  $\beta$  antiparalelas conectadas por asas. Estudios de mutagénesis en estas asas demostraron la participación de este dominio en el reconocimiento de moléculas que actuaban como receptores de las toxinas (Boonserm et al., 2006; Li et al., 1991).

El dominio III está compuesto por un emparedado de dos láminas  $\beta$  antiparalelas, formadas de 5 hebras  $\beta$ . Este dominio es el menos variable en cuanto a estructura entre las toxinas Cry de 3 dominios, determinando que además presentan similitud con los dominios de unión a carbohidratos de proteínas como la galactosa oxidasa, la sialidasa, la  $\beta$ -glucuronidasa, entre otras (De Maagd et al., 2003). Se ha determinado que este dominio también está involucrado en el reconocimiento e interacción con los receptores. Además, se ha identificado que tanto el dominio II como el dominio III están involucrados en la especificidad de estas toxinas (ver figura 4) (Bravo et al., 2007; Herrero et al., 2004; Jiménez-Juárez et al., 2007).





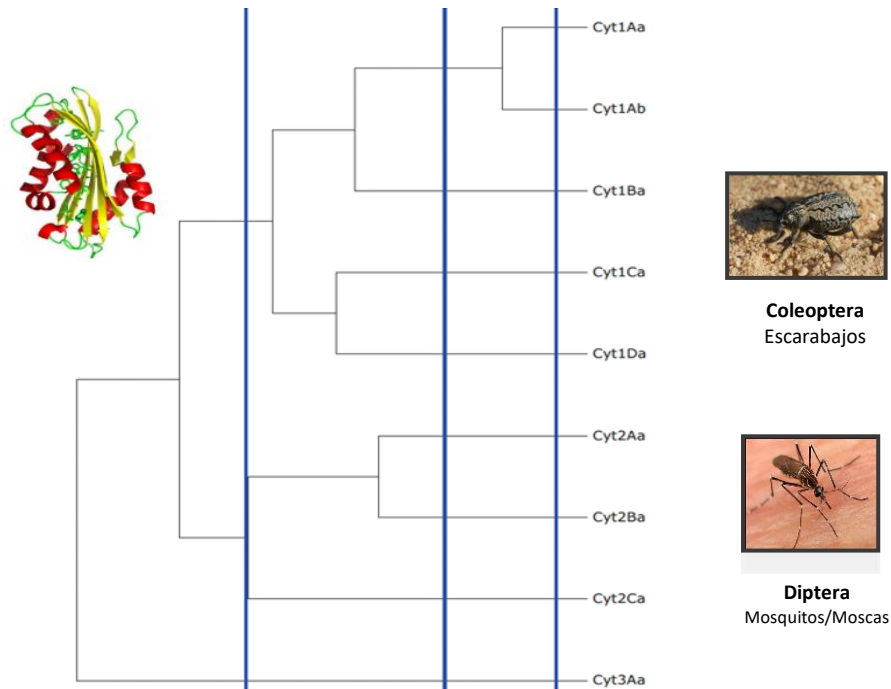
**Figura 5. Estructura cristalográfica de las toxinas Cry de 3 dominios.** Los tres dominios de la estructura están representados en diferentes colores, el dominio I en rojo, el dominio II en magenta y el dominio III en azul. Cry1Aa (PDB ID: 1CIY), Cry2Aa (PDB ID: 1I5Y), Cry3Aa (PDB ID: 1DLC), Cry3Bb (PDB ID: 1JI6), Cry4Aa (PDB ID: 2C9K), Cry4Ba (PDB ID: 1W99), Cry5B (PDB ID: 4D8M) y Cry8Ea (PDB ID: 3EB7). La especificidad de estas toxinas se muestra en la parte inferior de cada una de ellas (Familia de insectos blanco).

## Toxinas Cyt

Las toxinas Cyt son una familia de toxinas más pequeña, clasificadas en 3 grupos, las toxinas Cyt1, Cyt2 y Cyt3, cuyas clasificación se basa en su identidad de secuencia (ver figura 6) (Cohen et al., 2011, 2007; Li et al., 1996)

Las toxinas Cyt muestran especificidad a dípteros, en donde se ha observado que éstas, se producen solamente en cepas con actividad tóxica a mosquitos (Soberón et al, 2013). Algunas toxinas Cyt muestran toxicidad contra coleópteros como el caso de Cyt1Aa que es tóxica contra *Chrysomela scripta* y Cyt2Ca que es tóxica contra *Leptinotarsa decemlineata* y *Diabrotica* spp. Incluso se sabe que este tipo de toxinas tienen un efecto citotóxico más amplio, hacia células de mamífero de manera *in vitro*, entre ellas, células cancerígenas y eritrocitos (ver figura 6) (Bravo et al., 2018; Butko, 2003; Cohen et al., 2007; De Maagd et al., 2003; Federici & Bauer, 1998; Rupa et al., 2000; Thomas & Ellar, 1983a).

Estas toxinas presentan similitud estructural con otras proteínas de otros microorganismos patógenos, entre ellos la bacteria *Dickeya dadantii*, *Dickeya zea*, *Aeromonas salmonicida*, *Clostridium kluverii*, la actinobacteria *Streptomyces venezuelae* y el hongo *Giberella zea* (Soberón et al., 2013).



**Figura 6. Árbol filogenético de las toxinas Cyt.** De lado izquierdo se muestra la estructura tridimensional de la toxina Cyt1Aa de *Bti*. En el centro se muestra la filogenia de las toxinas citotóxicas Cyt. De lado derecho se muestran las familias de los organismos blanco de este tipo de toxinas (Coleópteros y Dípteros)

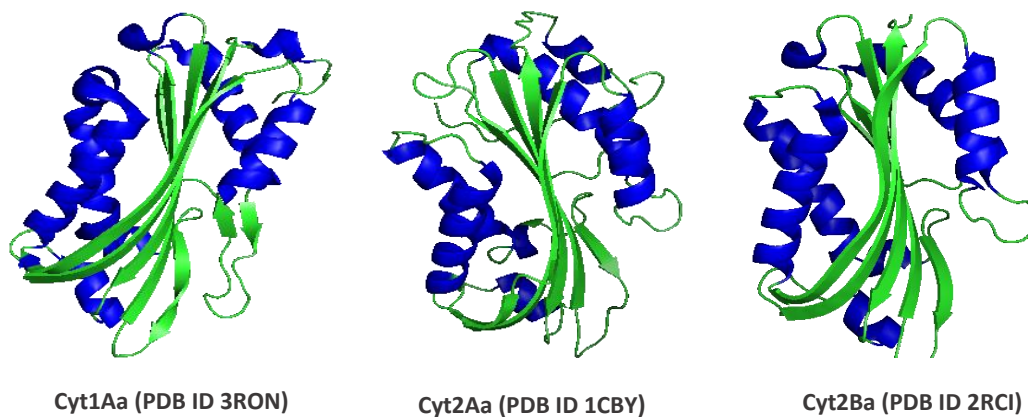
## Estructura de las toxinas Cyt

A partir de la estructura cristalográfica de las toxinas Cyt1Aa, Cyt2Aa y Cyt2Ba se ha determinado que este tipo de toxinas están compuestas por un solo dominio  $\alpha - \beta$  con siete u ocho láminas  $\beta$  envueltas por dos horquillas de hélices  $\alpha$  (ver figura 7) (Bravo et al., 2011; Cohen et al., 2011; Soberón et al., 2013)

Las hélices  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 se disponen en una misma horquilla, y las hélices  $\alpha$ -3,  $\alpha$ -4 y  $\alpha$ -5 en otra. Estas hélices muestran un carácter anfipático donde los aminoácidos hidrofóbicos se disponen hacia las láminas  $\beta$  (Bravo et al., 2011; Cohen et al., 2011).

Se ha propuesto que la región compuesta de láminas  $\beta$ , está involucrada en la inserción en la membrana celular del epitelio intestinal de las larvas de los insectos blanco, mientras que las hélices  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -3 están involucradas en la unión a los lípidos de membrana y la oligomerización de la toxina formando estructuras oligoméricas de alto peso molecular que se insertan en la membrana formando poros líticos que inducen a la muerte de la larva (Gazit et al., 1997, Cohen et al., 2011; Rojko & Anderluh, 2015, López-Díaz, Cantón, Gill, Soberón, & Bravo, 2013; Promdonkoy & Ellar, 2000; Promdonkoy et al., 2008).

A diferencia de las toxinas Cry 3d, este tipo de toxinas no parece tener una conformación de dominios con función particular, aunque existe evidencia del papel de ciertas regiones de la toxina en el efecto de sinergismo asociado a la región  $\beta$ -6, la hélice  $\alpha$ -5 y otro sitio en la  $\beta$ -7, la oligomerización asociada a las hélices  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -3, y la inserción a la membrana del intestino de las larvas del insecto blanco asociada a las láminas  $\beta$  (Cohen et al., 2011; López-Díaz et al., 2013; Pérez et al., 2005; Promdonkoy & Ellar, 2000).



**Figura 7. Estructura tridimensional de las toxinas Cyt de *B. thuringiensis* visualizadas en el servidor I-TASSER. Las hélices  $\alpha$  se encuentran en color azul y las láminas  $\beta$  en color verde.**

## Mecanismo de acción

El mecanismo de acción general de las toxinas 3d-Cry y Cyt comienza con la ingestión del cristal paraesporal por la larva del insecto, el cual es disuelto por el jugo gástrico del intestino de la larva, solubilizando a las protoxinas. Posteriormente, éstas sufren un corte proteolítico que permite la activación de las toxinas, las cuales interactúan con receptores específicos en las microvellosidades de las membranas de las células apicales del intestino, formando oligómeros que finalmente estructuran al poro celular que induce a la lisis osmótica y la muerte de la larva (ver figura 8A) (Bravo et al., 2007; Butko, 2003; Cohen et al., 2011; Li et al., 1996; Promdonkoy & Ellar, 2003).

Las condiciones del intestino como el pH y el ambiente reductor promueven la solubilización de estos cristales, liberando a la protoxinas.

Tanto las protoxinas Cry de 3 dominios como las protoxinas Cyt, sufren un corte preteolítico por proteasas intestinales, en el que se remueven varios aminoácidos de la protoxina para promover la conformación tóxica de estas toxinas.

En el caso de las toxinas Cry de 3 dominios se remueven 28 aminoácidos del amino terminal en un sitio conservado en estas protoxinas, así como los últimos 500 residuos del carboxilo terminal pasando de un protoxina de aproximadamente 130 kDa a una toxina activa de 55-65 kDa (Bravo et al., 2002)

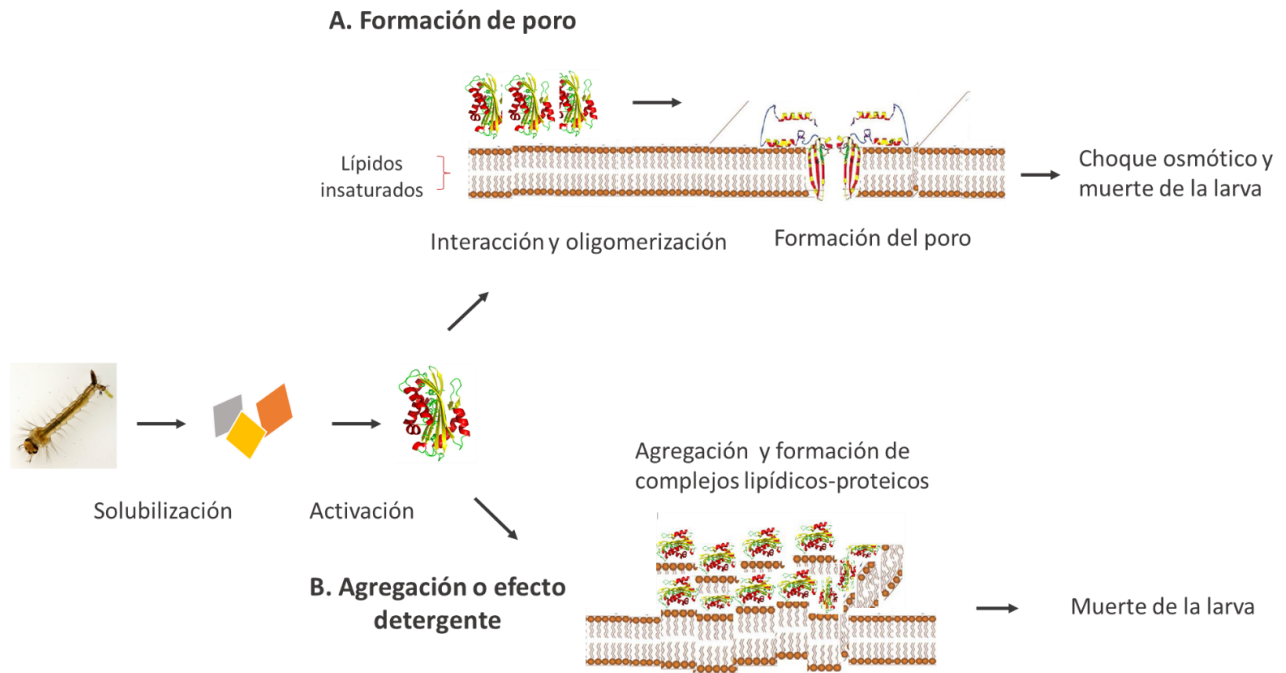
En el caso de las toxinas Cyt, se remueven aproximadamente 27 aminoácidos del amino terminal y del carboxilo terminal, pasando de un protoxina de 27 kDa a una toxina activa de 22-24 kDa (Al-Yahyaee & Ellar, 1996; Nisnevitch et al., 2006).

En el caso de las toxinas 3d-Cry, se ha propuesto que las toxinas requieren unirse con baja afinidad a los receptores proteicos asociados a glicosilfosfatidilinositol (GPI) como la alcalino fosfatasa (ALP) y la aminopeptidasa (APN), aumentando la concentración de la toxina y permitiendo que ésta se una a cadherina con mayor afinidad, lo que induce a un corte proteolítico del amino terminal de la toxina y a la oligomerización de la toxina. Posteriormente la toxina se une de nuevo a ALP y APN con mayor afinidad permitiendo la inserción y la formación del poro (Bravo et al., 2007).

Al contrario de las toxinas Cry que reconocen receptores proteicos en la membrana como la cadherina y las proteínas asociadas a GPI como la ALP y APN, las toxinas Cyt no reconocen un receptor proteico en la

membrana, sino que interactúan directamente con lípidos insaturados de membrana (Promdonkoy & Ellar, 2003; Thomas & Ellar, 1983b)

Hasta el momento no se ha encontrado ningún factor proteico que interactúe con las toxinas Cyt, e incluso la interacción y especificidad ha sido un tema poco estudiado en este tipo de toxinas.



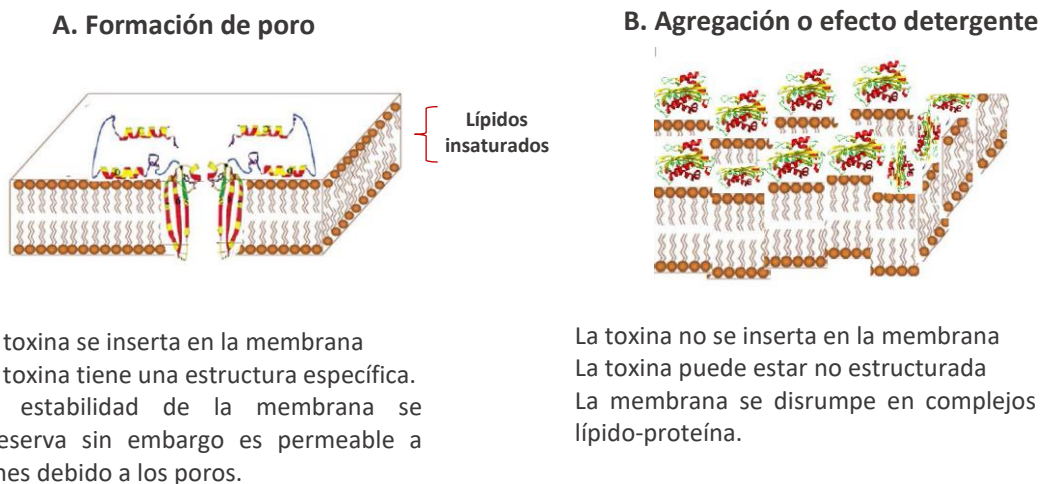
**Figura 8. Propuestas del mecanismo de acción de las toxinas citotóxicas Cyt de *B. thuringiensis*.** La representación de la estructura tridimensional de la toxina representa a la toxina Cyt1Aa de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*.

Con base en diferentes trabajos, se han propuesto dos posibles formas en que las toxinas Cyt tienen su efecto tóxico en las células blanco, uno en donde se da la formación de un poro en la membrana y otro en donde la toxina se agrega en la membrana.

El primer modelo llamado el modelo de formación de poro propone que esta toxina, a bajas concentraciones, se acopla en estructuras oligoméricas que inducen a la formación de un poro en la

membrana. Se propone que las hélices  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -3 permiten la interacción con los lípidos en la membrana media apical de las células del intestino de la larva, lo que induce a un cambio conformacional en la toxina, provocando que las hélices  $\alpha$  se desplieguen en un arreglo similar al de una sombrilla, y así, las láminas  $\beta$ -6,  $\beta$ -7 y  $\beta$ -8 queden expuestas para atravesar la membrana formando un poro de 1-2 nm en la membrana, lo que provoca la liberación de solutos y el posterior choque osmótico que lleva a la muerte de la larva (ver figura 8A-9A).

El segundo modelo llamado el modelo de detergente propone que, a altas concentraciones de la toxina, Cyt, ésta interactúa inespecíficamente con la membrana, propiciando la agregación de la toxina sobre la membrana, lo que provoca una disrupción de la estructura de la membrana celular, como lo que ocurre con los detergentes, provocando la lisis celular y la muerte de la larva. (ver figura 8B-9B)(Butko, 2003; S. Tharad et al., 2016).



**Figura 9. Características particulares de los dos modelos de interacción con la membrana celular de las toxinas citotóxicas Cyt de *B. thuringiensis*.** La representación de la estructura tridimensional de la toxina representa a la toxina Cyt1Aa de *Bti*. Modificado de Butko 2003.

Las toxinas Cry de tres dominios forman un poro transmembranal con las hélices  $\alpha$ , mientras que la propuesta es que las toxinas Cyt forman un poro por un barril  $\beta$ , por lo que se incluirían al grupo de toxinas

de tipo barril  $\beta$  que incluye a la aerolisina,  $\alpha$ -hemolisina y las toxinas dependientes de colesterol como la perfringolisina O (Cohen et al., 2011).

Incluso se ha determinado que en presencia de membranas lipídicas, las toxinas Cyt forman oligómeros de alto peso molecular aproximadamente de 400 kDa proponiendo que el oligómero se conforma de aproximadamente 16 monómeros de la toxina Cyt (Du et al., 1999).

Pese a todos estos análisis, el mecanismo de acción completo de las toxinas Cyt aún se desconoce, sin embargo la propuesta más aceptada por su evidencia experimental es que la toxina Cyt, así como las toxinas Cry, tienen un efecto tóxico por la formación de poros en la membrana, que inducen a un desbalance osmótico que finalmente desencadena la lisis celular y culmina con la muerte de la larva del insecto (ver figura 8A-9A) (Cohen et al., 2011; Knowles et al., 1989; Peraro & van der Goot, 2015).

Incluso se ha propuesto que ambos mecanismos no son mutuamente excluyentes, sino que la forma en que la toxina interactúe con la membrana dependerá de la concentración de la toxina.

## Interacción con lípidos

El mecanismo de interacción de las toxinas Cyt con la membrana celular, y por consiguiente su especificidad ha sido poco estudiado, sin embargo, existen algunos antecedentes de ello.

Thomas y Ellar analizaron la interacción de la toxina Cyt1Aa de *B. thuringiensis*, por medio de ensayos utilizando liposomas de diferentes concentraciones y composición lipídica para determinar la unión de la toxina Cyt con estas membranas sintéticas, y encontraron que la toxina Cyt1Aa sufre un efecto neutralizante, es decir pierde su efecto tóxico contra mosquitos y contra eritrocitos, tanto *in vivo* como *in vitro*, al interactuar con liposomas compuestos principalmente por fosfatidilcolina, así como con fosfatidiletanolamina, esfingomiélin y colesterol. Lo anterior demuestra que a diferencia de las toxinas Cry que interactúan con proteínas de membrana como la alcalina fosfatasa, la aminopeptidasa y la cadherina, las toxinas Cyt interactúan con lípidos insaturados (Thomas & Ellar, 1983b).

Ya sea que las toxinas tengan un efecto local, formando poros en la membrana, o un efecto citosólico, modificando algún blanco celular, las toxinas requieren de la interacción primaria con la membrana celular, y por ende con los lípidos que la componen. En el caso de las toxinas que forman poros, la acción local en la membrana requiere que éstas interactúen con lípidos tanto para el reconocimiento como para adquirir la

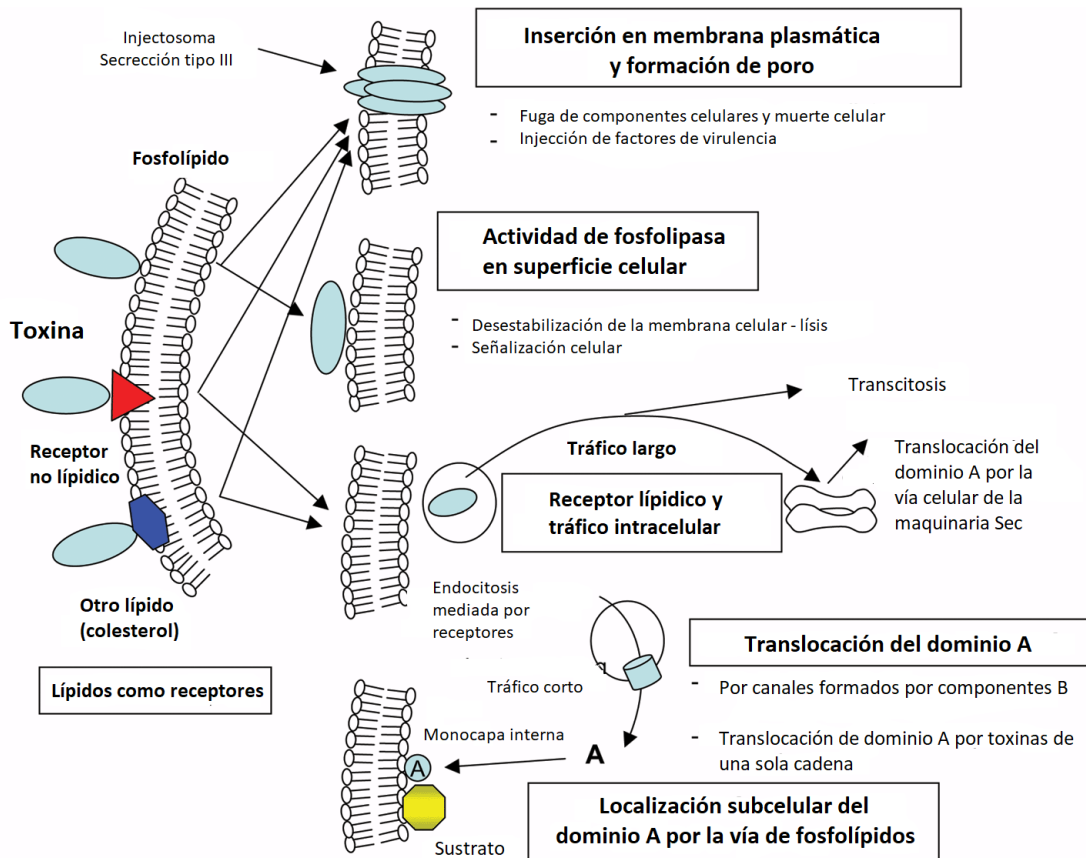
conformación que induce a la formación del poro, lo que promueve la liberación de nutrientes y la posterior muerte de las células. A su vez, las toxinas con efecto citosólico requieren interactuar con la membrana para promover la internalización de factores de virulencia hacia el citosol, ayudándose de vías de transporte celular para llegar a su blanco (Geny & Popoff, 2006a; 2006b)

La interacción con lípidos es un comportamiento que se ha determinado en otras toxinas, donde los lípidos actúan como receptores de estas toxinas, ayudando en el tráfico vesicular, e incluso, se ha determinado que ciertas toxinas requieren de dominios lipídicos en la membrana para su actividad tóxica.

Muchas toxinas requieren de ciertos lípidos o derivados de éstos para poder unirse a la membrana de su célula blanco. Entre ellas se encuentran las toxinas dependientes de colesterol como la citolisinas, la estreptolisina O (SLO) y la perfringolisina O (PLO), las actinoporinas que reconocen esfingomielina, la toxina del Shiga que se une al globósido Gb3, e incluso otras toxinas como las neurotoxinas del botulismo, del tétanos y la misma toxina del cólera que reconocen modificaciones a lípidos como los gangliósidos, así como otro tipo de toxinas que reconocen proteínas asociadas a glicofosfatidilinositol (GPI), como las mismas toxinas Cry (ver figura 10) (Farrand et al, 2010; Geny & Popoff, 2006a; 2006b; Reig & van der Goot, 2006).

Esto demuestra la gran importancia de los lípidos en el efecto tóxico de muchas toxinas bacterianas ya que no solo son indispensables para la unión de estas toxinas a la membrana de la célula blanco, sino que estos lípidos tienen un papel más amplio e importante en la oligomerización de estas toxinas, son importantes para encender las vías de señalización que se inducen en su efecto tóxico y para el tráfico celular de las toxinas con efecto citosólico.





**Figura 10. Papel de los lípidos en el reconocimiento celular y tráfico intracelular de toxinas bacterianas.**

Modificada de Geny & Popoff, 2006.

### Características de las toxinas Cyt

Las toxinas Cyt, así llamadas por su efecto citotóxico, son muy importantes en la toxicidad contra dípteros. La toxina Cyt1Aa de *Bti* fue la primera toxina en ser aislada y caracterizada debido a su abundancia del 45-50 % de todas las  $\delta$ - endotoxinas producidas por *Bti*.

*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* ha sido empleada en biocontrol de dípteros por más de 35 años, sin que se presente algún caso de resistencia a ella, esto debido principalmente a la presencia de una toxina particular, la toxina Cyt1Aa (Melo et al., 2016; Kamgang et al., 2011; Becker & Ludwig, 1993; Tetreau et al., 2013)

Este efecto de baja resistencia se debe principalmente a la propiedad de la toxina Cyt1Aa de sinergizar de manera individual con las toxinas Cry activadas, tras el corte proteolítico por proteasas, como Cry4Aa, Cry4Ba, y Cry11Aa, potenciando significativamente su toxicidad contra mosquitos (Crickmore et al., 1995; Tabashnik, 1992). Incluso se ha determinado que la toxina Cyt1Aa de *Bti* es capaz de sinergizar a *Bacillus sphaericus* contra el mosquito *A. aegypti*, a pesar de que *B. sphaericus* solo es tóxica contra los mosquitos del género *Anopheles* y *Culex* inherentemente, e incluso es capaz de restaurar la toxicidad a mosquitos *Culex* resistentes a *B. sphaericus* (Wirth & Walton, 2000a)

Se propuso que el efecto sinérgico se debía a la interacción física entre la toxina Cry y la toxina Cyt, en donde Cyt1Aa aumentaba el número de sitios de unión de las toxinas Cry, actuando como un receptor de éstas y permitiendo la oligomerización de las toxinas Cry (Pérez et al., 2005, 2007).

Se determinó que la región en Cyt1Aa involucrada en esta interacción comprende la región entre la lámina  $\beta$ -7 y la hélice  $\alpha$ -6 (Pérez et al., 2005). Incluso se ha demostrado que la Cyt1Aa permite superar la resistencia a las toxinas Cry4 y Cry11Aa de poblaciones del mosquito *Culex quinquefasciatus*, vector de la filarisis (Crickmore et al., 1995; Wirth & Walton, 2000b).

La toxina Cyt1Aa presenta toxicidad contra larvas de dípteros como moscas y mosquitos, entre ellos el mosquito *A. aegypti*, vector de enfermedades como el dengue, el chikungunya y el zika, y los mosquitos del género *Culex*, vectores de enfermedades como la filarisis y las encefalitis virales (Cohen et al., 2011).

Además de su actividad sinérgica e insecticida, se ha demostrado también que Cyt1Aa presenta citotoxicidad contra linfocitos y fibroblastos, así como actividad tóxica en eritrocitos en experimentos *in vitro* (Knowles et al., 1992). Incluso se ha determinado que la toxina Cyt1Aa tiene un efecto antibacterial ya que es bactericida contra una cepa patógena de *Escherichia coli* y bacteriostática contra *Staphylococcus aureus* (Cahan et al., 2008).

En el laboratorio se clonaron los dominios amino y carboxilo terminal de la Cyt1Aa, en donde el dominio N-terminal de Cyt1Aa presenta hélices  $\alpha$  que inducen a la oligomerización de esta toxina, y el C-terminal contiene a las láminas  $\beta$  que componen a la toxina. Estos ensayos demostraron que el dominio amino terminal inhibe la actividad hemolítica e insecticida de la toxina Cyt1Aa en larvas de *A. aegypti* de manera dominante negativa, ya que se requieren bajas concentraciones para su efecto inhibitorio de ambas actividades. Este resultado propone que el dominio N-terminal de la toxina Cyt1Aa tiene un papel importante en la actividad tóxica de la toxina hacia los tipos celulares blanco, aunque no se identificó la

región específica de este dominio involucrado en este fenómeno de oligomerización (Rodríguez-Almazan et al., 2012)

Por otra parte el dominio C terminal, compuesto por las láminas  $\beta$ -6 –  $\beta$ -8, es capaz de unirse a los liposomas sintéticos, compitiendo con la toxina Cyt1Aa marcada, demostrando que es esta región es la responsable de la inserción en la membrana lipídica (Rodríguez-Almazan et al., 2012).

La toxina Cyt1Aa presenta una estructura similar a la volvatoxina, una cardiotoxina formadora de poro del hongo *Volvariella volvaceae* y al factor de virulencia Evf de *Erwinia carotovora*, aunque la identidad de secuencia entre ellas es muy baja (10% y 4 % respectivamente) lo que permitiría resolver algunas preguntas sobre cómo actúan este tipo de toxinas desde una perspectiva estructural (Soberón et al., 2013).

## ANTECEDENTES

Como un primer acercamiento para entender la especificidad de la toxina Cyt1Aa, se realizó un análisis para reconocer por qué la toxina Cyt1Aa era tóxica contra el díptero susceptible *A. aegypti* pero no contra el lepidóptero no susceptible *Manduca sexta*.

Para responder a esta pregunta, se analizaron cada uno de los pasos del mecanismo de acción de la toxina Cyt1Aa con la finalidad de reconocer si alguno de ellos era limitante en la toxicidad contra un organismo no blanco, en este caso *M. sexta*. Con este trabajo se concluyó que la toxina Cyt1Aa es capaz de solubilizarse en un rango de pH más amplio (pH 9- pH 12), activarse con el jugo intestinal de larvas de *M. sexta*, e incluso es capaz de interactuar con BBMV (del inglés brush border membranes vesicles) obtenidas de larvas del *M. sexta*, concluyendo que la toxina Cyt1Aa es capaz de procesarse correctamente en larvas de *M. sexta* aunque no muestra un efecto tóxico en éstas (Cantón et al., 2014).

Además de los experimentos previos, en este trabajo se realizaron ensayos de unión por competencia por ELISA con BBMV tanto de larvas de *A. aegypti* como de larvas de *M. sexta*. Con los resultados obtenidos se comprobó que existían menos sitios de unión de Cyt1Aa en las BBMV de larvas de *M. sexta* en comparación con los sitios de larvas de *A. aegypti* (Cantón et al., 2014).

A pesar de estos resultados, no se pudo explicar la falta de toxicidad en larvas de *M. sexta*, dejando aún abierta la pregunta de qué es lo que le otorga especificidad a la toxina Cyt1Aa, y por ende la correlación con su efecto citotóxico.

Con esta premisa, y para así entender la función de las hélices  $\alpha$  de Cyt1Aa, se realizó un primer acercamiento a través de mutagénesis dirigida, construyendo así las mutantes A59C, A61C y F62R en la hélice  $\alpha$ -1 (<sup>49</sup>PNYILQAIMLANAFQNAL<sup>66</sup>), la mutante L85E en la hélice  $\alpha$ -2 (<sup>83</sup>KGLEIANT<sup>90</sup>) y las mutantes L120K, V122E, L123K y V126E en la hélice  $\alpha$ -3 (114VMINKVLEVLKTVL127). De estas mutantes propuestas solo se pudieron caracterizar a las variantes A59C, A61C, L120K, V122E, L23K y V126E debido a que las variantes L85E y F62R fueron inestables (López-Díaz et al., 2013).

En el caso de las variantes de Cyt1Aa V122E y V126E, éstas no fueron tóxicas contra larvas de *A. aegypti* ni hemolítica contra eritrocitos de conejo, lo que se relaciona con incapacidad de formar oligómeros en presencia de BBMV de larvas de *A. aegypti*, sugiriendo que la oligomerización de Cyt1Aa es necesaria para la toxicidad de este tipo de toxinas (López-Díaz et al., 2013).

Por el contrario, las variantes de Cyt1Aa L120K y L123K mostraron un aumento en la toxicidad de dos a tres veces contra larvas de *A. aegypti*, además de que preservaron su actividad hemolítica en eritrocitos de conejo (López-Díaz et al., 2013).

De manera aún más interesante, las variantes de Cyt1Aa A59C y A61C en la hélice  $\alpha$ -1, presentaron una disminución de su actividad hemolítica, particularmente la variante A59C presentó nula actividad hemolítica en eritrocitos. Ambas variantes preservaron su toxicidad contra larvas del mosquito *A. aegypti*, donde la variante A61C mostró un aumento significativo de 5 veces su toxicidad, mientras que la variante A59C mostró una disminución de 2 veces su toxicidad. Estas variantes fueron capaces de formar oligómeros en presencia de BBMV de larvas de *A. aegypti*. Estos datos demostraron que la toxicidad de la toxina Cyt1Aa a eritrocitos y a larvas de *A. aegypti* podía separarse por mutaciones puntuales en la hélice  $\alpha$ -1 (Bravo et al., 2018).

Las variantes de Cyt1Aa A59C y A61C fueron patentadas ya que además de presentar una mayor toxicidad hacia mosquitos para el caso de la variante A61C, ambas variantes aumentaron su toxicidad hacia un coleóptero plaga del maíz, *Diabrotica virgifera virgifera* (Bravo et al., 2018) Soberón et al., 2016). Este dato propone que existe una especificidad de la toxina Cyt1Aa contra el tipo celular, y que al menos la hélice  $\alpha$ -1 está involucrada en ello.

Todas las variantes de Cyt1Aa (A59C, A61C, L120K, V122E, L23K y V126E ) fueron capaces de sinergizar con la toxina Cry11Aa, resultados que permitieron concluir que la oligomerización de Cyt1Aa está directamente relacionada con la inserción a la membrana y la toxicidad hacia larvas de mosquitos y eritrocitos, pero que estos fenómenos son eventos independientes al sinergismo de Cyt1Aa con Cry11Aa (Bravo et al., 2018; López-Díaz et al., 2013).

En el caso de la toxina Cyt2Aa, con una similitud del 91% con Cyt1Aa, se realizó mutagénesis dirigida en 3 residuos de la hélice  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -3 de esta toxina. Las mutaciones de los residuos A61C y S108C mostraron una reducción en su capacidad hemolítica mientras que la mutación V109C mostró un comportamiento hemolítico similar al de la toxina Cyt2Aa silvestre. Sin embargo, la mutante A61C mostró una mayor toxicidad hacia *A. aegypti* así como hacia *Culex quinquefasciatus*, al contrario de las mutantes S108C y V109C que mostraron una menor toxicidad hacia *A. aegypti* y *Culex quinquefasciatus*. La mutación del residuo V109C siguió conservando su capacidad de formar oligómeros en membranas sintéticas, mientras que la mutación del residuo A61C sí afectó la oligomerización de la toxina, perdiendo su capacidad hemolítica pero

no su toxicidad hacia larvas de mosquitos apoyando la idea de un mecanismo de acción diferente para los tipos celulares (Promdonkoy et al., 2008).

Los datos anteriores permitieron proponer que las hélices  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -3 están involucradas en la oligomerización, proponiendo además que la toxicidad de Cyt1Aa a eritrocitos es independiente a la toxicidad hacia mosquitos, y de esta manera apoyando el papel de ambas hélices en la especificidad de la toxina Cyt1Aa (Bravo et al., 2018; López-Díaz et al., 2013)

Con este proyecto se propone continuar con la caracterización del papel de las hélices  $\alpha$ -1, así como el papel de la hélice  $\alpha$ -2 de la especificidad de la toxina Cyt1Aa de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* a través de un análisis por mutagénesis dirigida en estas dos hélices.

## HIPÓTESIS

Las hélices  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 están involucradas en la especificidad de la toxina Cyt1Aa de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.

## OBJETIVO

Determinar el papel de las hélices  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 en la especificidad de la toxina Cyt1Aa de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.

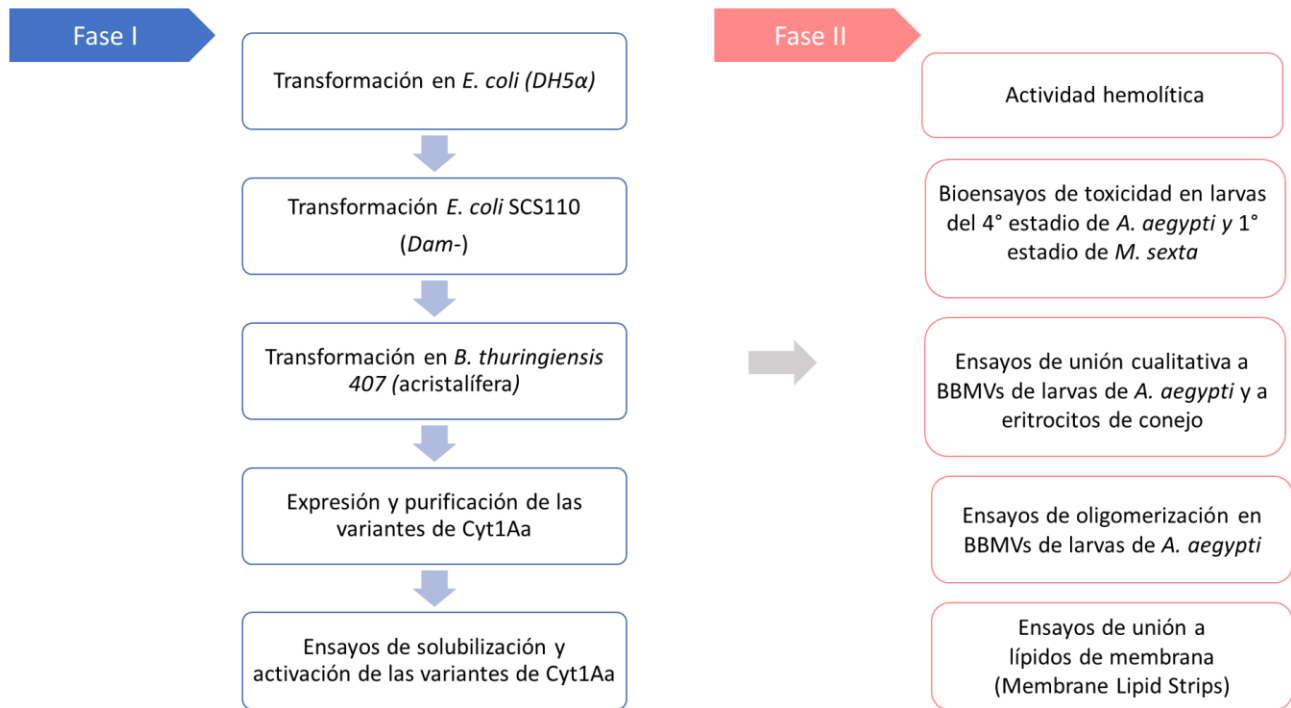
## METAS PARTICULARES

- Realizar las mutantes puntuales en la hélice  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 de *cyt1Aa*.
- Analizar si las variantes de Cyt1Aa presentan una afectación en la actividad hemolítica en eritrocitos de conejo.
- Analizar si las variantes de Cyt1Aa presentan una afectación en la actividad tóxica en larvas del 4° estadio de *A. aegypti*.
- Caracterizar las variantes afectadas en especificidad (variantes no tóxicas contra eritrocitos y/o larvas de *A. aegypti*) a través de ensayos de unión en vesículas de las microvellosidades de la membrana del intestino medio (BBMVs) de larvas del 4° estadio de *A. aegypti*, en eritrocitos de conejo y en ensayos de interacción con lípidos de membrana.
- Caracterizar las variantes afectadas en toxicidad hacia larvas de *A. aegypti* a través de ensayos de oligomerización en presencia de vesículas de las microvellosidades de la membrana del intestino medio de larvas (BBMVs) del 4° estadio de *A. aegypti*.

## METODOLOGÍA

A continuación, se reportan detalladamente la metodología experimental empleada para el desarrollo de este proyecto.

### Diagrama de flujo de metodología empleada en este proyecto



### Cepas utilizadas

*Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 $\alpha$  Genotipo: *fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44  $\Phi$ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* (Invitrogen). Cepa producto de ingeniería genética que permite una alta eficiencia de transformación con 3 mutaciones principales: *recA1* que inhibe la recombinación, *endA1* que permite la inserción plasmídica y *lacZM15* que permite la selección visual con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido).



*E. coli* SCS110, deficiente en dos sistemas de metilasas (Dam y Dcm); Genotipo: *rpsL (Strr) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZΔM15* (Stratagene).

Cepa de *B. thuringiensis* 407 Cry<sup>-</sup> acristalífera que carece de capacidad para sintetizar toxinas debido a la pérdida de los plásmidos que contienen los genes que codifican para las toxinas Cry y Cyt (Agaisse and Lereclus, 1995).

## Medios de cultivo

Durante este trabajo se emplearon los siguientes medios de cultivo para las cepas utilizadas en este proyecto (ver tabla 1).

**Tabla 1.** Composición de Medios de Cultivo

Nombre	Composición		Comentarios
<b>LB</b>	Bacto Triptona	10 g/L	Ajustar el pH a 7 con NaOH y esterilizar.
	Extracto de levadura	5 g/L	
	NaCl	10 g/L	
<b>LBagar</b>	Medio LB pH 7.0	1L	Esterilizar. Dejar enfriar hasta ~50°C y añadir, si procede, el antibiótico de selección. Distribuir en cajas petri y dejar solidificar. Conservar a 4°C
	Agar	15 g	
<b>SOB</b>	Bacto Triptona	20 g/L	Se ajusta el pH a 7.0 con NaOH y esterilizar. Si se utiliza el medio SOB agregar 10 ml/L de una solución de MgCl <sub>2</sub> 2M y 10 ml de Glucosa 1M ambas previamente esterilizadas.
	Extracto de levadura	5 g/L	
	NaCl	0.5 g/L	
	KCl	0.186 g/L	
<b>BHI</b>	Infusión cerebro-corazón	37 g/L	Esterilizar.
<b>BHIG</b>	Infusión cerebro-corazón	37 g/L	Al medio BHI se le agrega glicerol al 10%.

<b>HCT</b>	Bacto Triptona	5 g/L	Ajustar el pH a 7.25 con KOH y esterilizar. Antes de usar complementar con 50 ml de la Sol I, 1 ml de la Sol II, 10 ml de la Sol III, 10 ml de la Sol IV y 30 ml de Glucosa al 10% por cada litro.
	Casa-aminoácidos	2 g/L	
			Solución I: K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 62 g/L
			Solución II: MgSO <sub>4</sub> – 7H <sub>2</sub> O 12.3 g/L
			MnSO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O 0.169 g/L
			ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O
			Solución III: FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O
			H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
			Solución IV: CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O
<b>YENB</b>	Extracto de Levadura	7.5 g/L	Ajustar pH a 7.0 con NaOH, y esterilizar.
	Caldo Nutritivo	8.0 g/L	

## Mutagénesis

Para la mutagénesis puntual de los aminoácidos I52, L53, Q54, A55, I56 y A65 en la hélice  $\alpha$ -1, y en los aminoácidos K83, G84, L85, E86 y A88 en la hélice  $\alpha$ -2 de la toxina Cyt1Aa, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos mutagénicos para la sustitución de estos aminoácidos por una cisteína (ver tabla 2), los cuales se sintetizaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, UNAM.

**Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos mutagénicos diseñados.** El codón en negritas es el que se sustituyó para la codificación de un residuo de cisteína con el codón preferencial TGT

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA DE DNA
I52C	GAA ATT GAT AAT CCG AAT TAT <b>TGT</b> TTG CAA GCA ATT ATG TTA G
L53C	GAT AAT CCG AAT TAT ATA <b>TGT</b> CAA GCA ATT ATG TTA GCA AAT G
Q54C	GAT AAT CCG AAT TAT ATA TTG <b>TGT</b> GCA ATT ATG TTA GCA AAT GC

A55C	CCG AAT TAT ATA TTG CAA <u>TGT</u> ATT ATG TTA GCA AAT GCA TTT C
I56C	CCG AAT TAT ATA TTA CAA GCA <u>TGT</u> ATG TTA GCA AAT GCA TTT C
A65C	GCA AAT GCA TTT CAA AAT <u>TGT</u> TTA GTT CCC ACT TCT ACA
K83C	GCC CTA CGC TTT AGT ATG GCA <u>TGT</u> GGT TTA GAA ATC GCA AAC AC
G84C	CTA CGC TTT AGT ATG GCA AAA <u>TGT</u> TTA GAA ATC GCA AAC AC
L85C	C TTT AGT ATG GCA AAA GGT <u>TGT</u> GAA ATC GCA AAC ACA ATT AC
E86C	GT ATG GCA AAA GGT TTA <u>TGT</u> ATC GCA AAC ACA ATT ACA CC
A88C	GCA AAA GGT TTA GAA ATC <u>TGT</u> AAC ACA ATT ACA CCG ATG

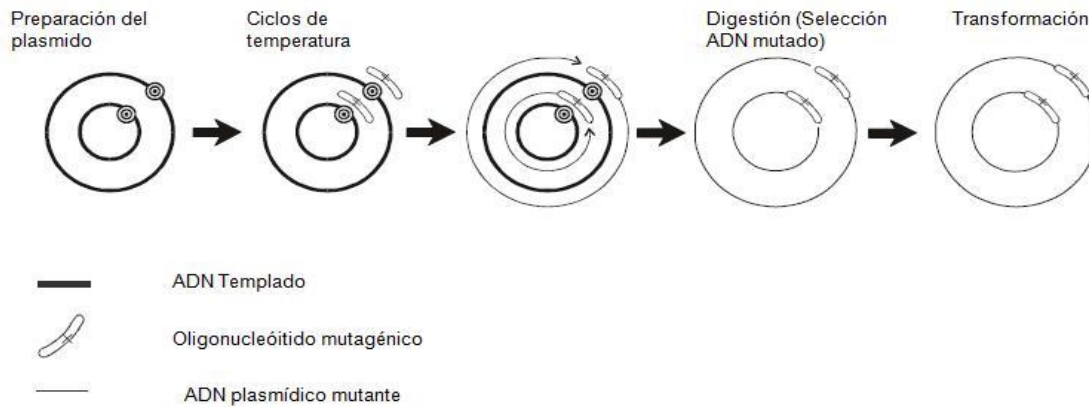
Para la mutagénesis puntual se utilizó el paquete comercial Quickchange<sup>®</sup> Multi-site Directed Mutagenesis Kit de Stratagene (Agilent Technologies, Estados Unidos), siguiendo las especificaciones del fabricante (ver figura 11).

Con estos oligonucleótidos se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), empleando 0.5 µl de DMSO, 1 µl MgCl<sub>2</sub>, Buffer polimerasa Phusion 1x, 1.5 µl oligonucleótido mutagénico, 1 µl dNTPs, 0.5 µl polimerasa Phusion, 2 µl plásmido pFW45 como templado y el resto de agua para una reacción final de 50 µl. Para ello se empleó el siguiente programa de amplificación (ver tabla 3).

TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
98°C	30 segundos	1 ciclo
98°C	30 segundos	
55 °C	1 minuto	35 ciclos
72°C	5 minutos	
72°C	7 minutos	1 ciclo

**Tabla 3.** Programa empleado para la reacción de PCR.

Estos productos de PCR se digirieron con la enzima de restricción Dpn1, la cual corta en sitios del DNA metilados, en este caso el plásmido pFW45 empleado como molde en la reacción de amplificación. La reacción se realizó adicionando 1x de Buffer y 0.5 - 1  $\mu$ l de Dpn1 (New England Biolabs), las cuales se incubaron a 37°C por 2 horas.



**Figura 11.** Esquema general de la estrategia de mutagénesis empleada en este estudio

### Purificación de producto de PCR

Para la purificación del producto de PCR se siguieron las instrucciones del protocolo MinElute® PCR Purification Kit de Qiagen. Primero se añadieron 250  $\mu$ l de la solución de unión (hidrocloruro de guanidina e isopropanol) a las reacciones de PCR y se mezclaron suavemente. Posteriormente se transfirió la solución a una columna de purificación con una membrana de sílica y se centrifugó a 16873 x g por 1 minuto. El precipitado se descartó, y en seguida se le agregaron 700  $\mu$ l de la solución de lavado (contiene etanol) a la columna, y se centrifugó a 16873 x g por 1 minuto. Este paso se repitió con 500  $\mu$ l de la solución de lavado, descartando el precipitado. La columna se centrifugó a 16873 x g por 1 minuto por segunda vez para eliminar restos de etanol de la membrana. Después, la columna se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo y se le adicionaron 40  $\mu$ l de agua destilada, esperando 1 minuto para permitir la interacción con la columna. Finalmente se centrifugó a 16873 x g por un minuto para recuperar el DNA obtenido de la reacción de PCR de la mutagénesis puntual. Estos productos se almacenaron a 4 °C.

### Células electrocompetentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$

Para hacer las células electrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , se puso inoculó un cultivo de 25 ml de medio YENB con células de la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  incubando en agitación toda la noche a 37°C. Al día siguiente se inoculó un cultivo de 1 lt de medio YENB con 5-10 ml del cultivo crecido durante toda la noche, y se creció a 37°C hasta que éste alcanzo una DO<sub>600</sub> de 0.5-0.6. Una vez alcanzada esta densidad óptica, el cultivo se colocó en hielo y se centrifugó 10 minutos a 1157 x g a 4°C. Luego, la pastilla celular se resuspendió y se lavó con 100 ml de agua destilada fría y estéril. Después se centrifugo 10 minutos a 1157 x g a 4°C y se lavó con glicerol al 10% frío. Posteriormente la pastilla celular se resuspendió en 2-3 ml de glicerol al 10% frío, para finalmente hacer alícuotas de 50  $\mu$ l en tubos Eppendorf de 0.6 ml. Estas alícuotas se almacenaron a -70°C para su posterior uso.

### Células quimicompetentes de *Escherichia coli* SCS110

Para hacer las células quimicompetentes de *E. coli* SCS110, se inoculó un cultivo de 5 ml de medio LB con la cepa de *E. coli* SCS110 durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se inoculó un cultivo de 100 ml de medio LB con 2 ml del cultivo crecido durante toda la noche, y se dejó crecer a 37°C hasta que éste alcanzo un DO<sub>600</sub> menor a 0.4. Una vez alcanzada esta densidad óptica, el cultivo se colocó en hielo y se centrifuga 10 minutos a a 4°C. Luego, la pastilla celular se resuspendió en 10 ml de una solución CaCl<sub>2</sub> 60 mM y glicerol frío al 15%. Después se incubó 30 minutos en hielo para luego centrifugar 10 minutos a 1157 x g a 4°C. Posteriormente se resuspendió la pastilla celular en 2 ml de la solución de CaCl<sub>2</sub> y glicerol, incubando 1 hora en hielo, para finalmente alicuotar 50  $\mu$ l en tubos Eppendorf de 0.6 ml. Estas alícuotas se almacenaron a -70°C para su posterior uso.

### Células electrocompetentes de Bt 407- (acristalífera)

Para realizar las células electrocompetentes de *Bt*, se creció la cepa *Bt* 407-en una caja de medio LB a 30°C por 24 horas. Posteriormente se repitió el paso anterior para así tener las células en una fase de crecimiento homogéneo. Seguido de esto se volvió a crecer de nuevo la cepa por un periodo de 4-5 horas en medio líquido LB a 30°C. A partir de este cultivo se inoculó 1 lt de medio BHI adicionado con glicerol al 0.1%, hasta que este alcanzó un DO<sub>600</sub> de 0.5. Después se recuperaron las células centrifugando a 3214 x g por 5 minutos

a 4°C. Posteriormente se resuspendió suavemente en 30 ml de solución EB (sacarosa .625M, MgCl<sub>2</sub> 1mM) y se centrifugó a 3214 x g por 5 minutos a 4°C. Este paso se repitió al menos 2 veces y finalmente la pastilla celular se resuspendió en 1 ml de solución EB para después usarlas para su uso en el proceso de transformación inmediata.

### Purificación de Plásmido en pequeña escala (Mini-preparaciones)

Para aislar el DNA plasmídico de las células de interés, se siguió el protocolo del paquete Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega. Una vez obtenidas colonias, se pusieron cultivos de 3 ml de LB Amp (10 mg/ ml) con las colonias positivas de *E. coli* DH5 $\alpha$ , los cuales se incubaron hasta fase estacionaria durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente estos cultivos se centrifugaron en un tubo Eppendorf a 16873 x g por 5 minutos, descartando posteriormente el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió con 250  $\mu$ l de la solución de Resuspensión Celular (Tris pH = 7.4 50 mM EDTA 10 mM RNAsa A 100  $\mu$ g/mL). Después se les agregaron 250  $\mu$ l de la solución de Lisis Celular (NaOH 200 mM SDS 1%) y 10  $\mu$ l de la solución Alcalino Proteasa, invirtiendo los tubos 4 veces e incubando a temperatura ambiente por 5 minutos. Inmediatamente después, se le agregaron 350  $\mu$ l de la solución de Neutralización (KoAC 3M pH = 5.5), invirtiendo 4 veces, para posteriormente centrifugarlo a 16873 x g a temperatura ambiente durante 10 minutos. El sobrenadante se traspasó a una columna de sílica gel (Promega) agregándole 750  $\mu$ l de la solución de Lavado (acetato de potasio 162.8mM, Tris-HCl 22.6mM (pH 7.5), EDTA 0.109mM (pH 8.0) y etanol), centrifugándolo a 16873 x g durante 1 minuto. Después se repitió este paso con 250  $\mu$ l de la solución de Lavado centrifugando a 16873 x g durante 10 minutos para eliminar cualquier resto de solución. Finalmente, la columna se traspasó a un tubo Eppendorf nuevo y se le agregaron 40  $\mu$ l de agua para después centrifugarla a 16873 x g durante 2 minutos. Estos plásmidos se cuantificaron con ayuda del espectrofotómetro de microgota NanoDrop y después se almacenaron a -20°C.

### Comprobación de la amplificación de *cyt1Aa*

Para comprobación de la expresión del gen *cyt1Aa* y las mutantes en las cepas *DH5 $\alpha$* , *SCS110* (Dam-) y *Bt* 407- se realizó una reacción de PCR empleando 1x del buffer de Taq polimerasa, 2  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>, 500-800 ng de DNA (plásmidos), 1.5  $\mu$ l (30 pmol) del oligonucleótido *Cyt1AaF* (TGTGAATTCATGGAAAATTTAAATCATTG) y 1.5  $\mu$ l (30 pmol) del oligonucleótido *Cyt1AaR* (CTACTCGAGGAGGGTTCCATTAATAGC), 1  $\mu$ l de la polimerasa

Taq y el resto de agua para una reacción final de 50  $\mu$ l. Para ello se empleó el siguiente programa de amplificación (ver tabla 4).

TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
95°C	30 segundos	1 ciclo
95°C	30 segundos	
55 °C	30 segundos	35 ciclos
72°C	1 minuto	
72°C	3 minutos	1 ciclo

**Tabla 4.** Programa empleado para la reacción de cadena de la polimerasa (PCR).

## Secuenciación

Las muestras fueron analizadas y secuenciadas por la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología-UNAM, en un secuenciador automático de DNA de 16 capilares (Applied Biosystems, modelo 3130 XL, Estados Unidos). Las secuencias obtenidas se compararon con el programa Bioedit y Clustal W2 para reconocer los respectivos cambios en la secuencia de *cyt1Aa* (McWilliam et al., 2013).

## Transformación en células electrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$

Para la incorporación de diferentes plásmidos se empleó el siguiente protocolo de transformación física por electroporación. Para ello se emplearon alícuotas de 40  $\mu$ l de células electrocompetentes *E. coli* DH5 $\alpha$ , a las cuales se les agregó 1200 ng/  $\mu$ l del plásmido mutagénico de cada una de las mutantes de *cyt1Aa*. Posteriormente se electroporaron en una celda de electroporación de 0.1cm aplicando un voltaje de 1.8 volts y 200 mA. En seguida, se recuperaron las células en 1 ml de medio SOB adicionado con 32  $\mu$ l de Glucosa 10% y 10  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 1M. Posteriormente se llevó a cabo la recuperación de las células en agitación por 1 hora a 37°C. Transcurrido este tiempo, se sembraron 100 y 200  $\mu$ l del cultivo en cajas de agar sólido LB con

Ampicilina (10µg/ml) independientes, incubándolas toda la noche a 37°. Transcurrido este tiempo se purificaron los plásmidos siguiendo el protocolo descrito previamente de purificación de plásmido en pequeña escala

#### Transformación en células quimiocompetentes de *E. coli* SCS110

Para la incorporación de diferentes plásmidos se empleó el siguiente protocolo de transformación por quimiocompetencia. Para ello se emplearon alícuotas de 40 µl de células quimiocompetentes *E. coli* SCS110, a las cuales se les agregó 1500-2000 ng del plásmido mutagénico de cada una de las mutantes de *cyt1Aa* purificado a partir de las células de *E. coli* DH5α, dejándolas en hielo por 30 minutos. Posteriormente se les dio un choque térmico a 42°C por 2 minutos, dejándolas enfriar de nuevo en hielo por 5 minutos. Después las células se dejaron en recuperación en 500 µl de medio LB sin antibiótico a 37°C a 16 x g por 1 hora. Pasado este tiempo se transfirieron a cultivo de 5 ml de medio LB Ampicilina (10µg/ml) y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se purificaron los plásmidos siguiendo el protocolo descrito previamente de purificación de plásmido en pequeña escala.

#### Transformación en células electrocompetentes de *B. 407-* (acristalífera)

Para la incorporación de DNA se empleó el siguiente protocolo de transformación por electrocompetencia en células de *B. thuringiensis* como se ha descrito previamente (Wu et al., 1994). Se emplearon 200 µl de las células electrocompetentes de *Bti 407-*, a las cuales se les agregó 2000 ng del plásmido mutagénico de cada una de las mutantes de *cyt1Aa*, colocándolas en celdas de electroporación de 0.4 mm y dando un pulso de 2.5 volts y 1000 mA. Seguido de esto se dejaron reposar 5 minutos en hielo para después incubar en 1 ml de medio BHIG a 30°C por 1 hora en una incubadora a 550 rpm. Después se estriaron 250 µl del cultivo en cajas LB Eritromicina (10 µg/ml) y se dejan incubar toda la noche. Al siguiente día, las colonias obtenidas se crecieron en cajas de medio HCT Eritromicina (10 µg/ml) para inducir a esporulación.



## Producción y purificación de cristales proteicos (solución espora-cristal)

Previo a la inducción de la esporulación de las cepas se sincronizaron los cultivos aislando colonia única y una vez de que las cepas esporularon en el medio HCT se realizó un choque térmico a 80°C por 25 minutos en medio LB y luego se plaquearon.

Para inducir a esporulación las cepas se crecieron en 7-10 cajas de medio HCT Eritromicina (10 µg/ml) a 30°C por 3-4 días hasta observar un 80% de esporulación en el cultivo en el microscopio. Después de esto, la biomasa fue recuperada y colocada en tubos estériles en una solución de lavado (0.3M NaCl y 0.01M EDTA pH 8.0). La pastilla se lavó con esta solución 5 veces, homogeneizando vigorosamente y centrifugando a 514 x g durante 15 minutos. Después la pastilla se lavó con una solución de PMSF 1 mM, centrifugando a 514 x g durante 15 minutos para finalmente recuperar la muestra de espora-cristal y almacenarla en la solución de PMSF 1mM a 4°C.

## Cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración de proteína de la forma de espora-cristal y la toxina solubilizada se empleó el método colorimétrico de Bradford, determinado la concentración a 595nm en un espectrofotómetro convencional.

Por el contrario, la concentración de las toxinas activadas y las toxinas biotiniladas se evaluaron en el espectrofotómetro de microvolumen Nanodrop a 280nm. Para corroborar estos resultados se evaluó la concentración de dichas proteínas con respecto a concentraciones determinadas de BSA en una electroforesis en un gel SDS-PAGE al 15% para comparar ambos resultados y estimar la concentración de estas toxinas.

## Solubilización y activación de toxinas

Para solubilizar los cristales se empleó un amortiguador de carbonatos (50 mM de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>) con un pH 10.5 o en su caso NaOH 50 mM con un pH 8 para la variante L85C, en una reacción con 500 µl del buffer de carbonatos, 60 µl de espora-cristal y β-mercaptoetanol al 0.02%. Estas reacciones se incubaron a 37°C

para las variantes obtenidas excepto para la toxina L85C que se incubó a 4°C. La reacción de solubilización se realizó en una incubadora con agitación a 650 rpm durante 2 horas. Posteriormente se centrifugó a 16873 x g por 10 minutos a temperatura ambiente, separando el sobrenadante del pellet, y almacenando el sobrenadante a 4 °C.

La toxina L85C solubilizada en NaOH se dializó en un volumen con una relación 1:1000 del volumen del amortiguador de fosfato de buffer salino (PBS NaCl 137mM, KCl 2 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM pH 10).

Para la activación de las toxinas se ajustó el pH a 8 de la concentración de toxina a activar, agregando ¼ del v/v del amortiguador Tris-HCl 1M pH 8.0 para permitir un correcto pH para la tripsinización. Luego se le agregó la tripsina en una relación 1:50 tripsina:toxina y se incubó a 37°C en una incubadora con agitación a 650 rpm durante 1 hora. Tras el tiempo de incubación se paró la reacción de tripsinización con PMSF 1 mM, y después se centrifugó, recuperando el sobrenadante y almacenándolo a 4°C.

Para el caso de la toxina L85C, no se tuvo que ajustar el pH ya que la reacción de solubilización en NaOH 50 mM ya se encuentra en un pH de 8. La reacción de tripsinización de la toxina L85C se realizó igualmente en una relación 1:50 tripsina:toxina a 4°C en una incubadora con agitación a 650 rpm durante 1 hora.

## Bioensayos

### A. Larvas del mosquito *A. aegypti*

Para determinar el efecto en la toxicidad se realizaron bioensayos de toxicidad en larvas de *A. aegypti*, las cuales, se cultivaron en las instalaciones del insectario del Instituto de Biotecnología en condiciones de 28°C, 75% de humedad y con un fotoperiodo luz-oscuridad de 12hrs/12hrs. Estos ensayos de toxicidad se realizaron con 10 larvas del 4° estadio del mosquito *A. aegypti* en 100 ml de agua no clorada en vasos de plástico desechables incorporando diferentes concentraciones de la suspensión de espora-cristal de las toxinas evaluadas en el agua con ayuda de una micropipeta, analizando la respuesta de mortalidad (larvas vivas y larvas muertas) tras un período de 24 horas y después de 48 hrs. Estos experimentos se realizaron con 2 réplicas biológicas (larvas de diferente ovoposición) y 3 réplicas experimentales (larvas de misma ovoposición/tratamiento independiente).

La mortalidad de las larvas se analizó agitando levemente los vasos para evaluar si las larvas presentaban movimiento o no, dado que estas larvas presentan un comportamiento característico de movilidad vertical en el agua (abajo hacia arriba y viceversa).

Para este ensayo se emplearon los respectivos controles (larvas de *A. aegypti* del 4° estadio sin toxina). Los resultados se analizaron estadísticamente para obtener la dosis letal media (LC<sub>50</sub>) y los límites de confianza del 95% con el programa Probit (Polo-PC LeOra Software).

## B. Larvas de lepidóptero *Manduca sexta*

Para determinar el efecto en la toxicidad se realizaron bioensayos de toxicidad en larvas de *A. aegypti*, las cuales, se cultivaron en las instalaciones del insectario del Instituto de Biotecnología en condiciones de 28°C, 75% de humedad y con un fotoperiodo luz-oscuridad de 12hrs/12hrs. Estos ensayos de toxicidad se realizaron con 25 larvas del 1° estadio del lepidóptero *M. sexta*. Las larvas se colocaron individualmente en pozos de placas de 24 pozos con dieta artificial a la cual se le adiciono una concentración alta de 1000 ng/cm<sup>2</sup> de las variantes de Cyt1Aa generadas, analizando la respuesta de mortalidad (larvas vivas y larvas muertas) tras 168 horas (7 días). Para este ensayo solo se realizó una réplica biológica (larvas de diferente ovoposición) con 3 réplicas experimentales (larvas de misma oviposición/tratamiento independiente).

La mortalidad de las larvas se analizó por la respuesta de movimiento y cambios en el color de las larvas de *M. sexta*.

Ya que no se analizó la respuesta de toxicidad de las larvas del 1°estadio del lepidóptero *M. sexta* a diferentes dosis de las variantes de Cyt1Aa, no se pudieron obtener los valores de dosis letal media (LC<sub>50</sub>) de cada una de éstas.

## Ensayos de hemólisis

Para determinar el efecto hemolítico se realizaron los ensayos de hemólisis en eritrocitos de conejo. Los eritrocitos de conejo se lavaron 3 veces con la solución Alsever anticoagulante (0.1 M dextrosa, 0.07 M NaCl, 0.02 M de citrato de sodio, 0.002 M de citrato pH 7.4) y se diluyeron a una concentración de  $2 \times 10^8$  eritrocitos/ml (DO<sub>600</sub> 1.0-1.2) en la misma solución. Se realizaron las pruebas con 20 µl de los eritrocitos y

diferentes concentraciones de toxina Cyt1Aa y variantes (50, 100, 200, 400, 800, 1600 y 3200 ng/ml) en una reacción final de 200  $\mu$ l la cual se incubó a 37°C por 30 minutos en placas de 96 pozos. El sobrenadante se recuperó tras centrifugar a 804 x g por 5 minutos a 4°C y se traspasó a una nueva placa de 96 pozos. La actividad hemolítica se analizó en un lector de placas a una longitud de onda de 405 nm para medir la liberación de hemoglobina por efecto hemolítico de la toxina. Para este ensayo se emplearon controles positivos de hemólisis (agua no clorada DO<sub>405</sub>= 1.0 – 1.1, 100% hemólisis) y controles negativos (solución Alsever sin toxina DO<sub>405</sub>= 0.01 – 0.03, 0% hemólisis). Estos ensayos se realizaron con 4 réplicas biológicas (eritrocitos de diferente toma de sangre del mismo conejo) y 3 réplicas experimentales cada una (eritrocitos de la misma toma se sangre/tratamiento independiente).

### Análisis de expresión cualitativa western blot

Para comprobar el que las toxinas obtenidas eran variantes de la toxina Cyt1Aa de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* se realizó un ensayo de expresión cualitativa de tipo western blot.

Las variantes de Cyt activadas se cuantificaron y se analizaron 0.5  $\mu$ g de éstas. Las toxinas se hirvieron con mezcla lítica por 5 minutos y se separaron por electroforesis en un gel de acrilamida al 15% (2.5 ml de acrilamida bisacrilamida, 1.3 ml de Tris 1M pH 8.8, 50  $\mu$ l de dodecilsulfato sódico (SDS), 50  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10 %, 1.2 ml de H<sub>2</sub>O desionizada y 3  $\mu$ l de tetrametiletilenediamina TEMED (Sigma) y al 4 % (333  $\mu$ l de acrilamida bisacrilamida, 250  $\mu$ l de Tris 1M pH 6.8, 20  $\mu$ l de dodecilsulfato sódico (SDS), 25  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10%, 1.4 ml de H<sub>2</sub>O desionizada y 1.5  $\mu$ l de TEMED a 25mM en un amortiguador de proteínas (14.4 g de glicina, 3 g de Tris Base, 10 ml de SDS 10 % para un litro de buffer).

Las proteínas se transfirieron a una membrana de polivinil, en un cámara de transferencia con un amortiguador de transferencia (0.32 g de carbonato de sodio, 0.84 g de bicarbonato de sodio, 200 ml de metanol y aforando con H<sub>2</sub>O destilada fría a un litro), superponiendo el gel de electroforesis con la membrana a 250mA por una hora en agitación. Posteriormente la membrana se lavó 5 veces con PBS y luego con PBS Tween al 2% por 30 minutos. Luego se realizaron 5 lavados con PBS Tween al 0.1% dejando la membrana 8 minutos en cada uno de estos lavados.

Seguido de esto, se bloqueó la membrana con leche descremada al 5% durante toda la noche a 4°C en agitación lenta y constante. Tras este tiempo, se realizaron 2 lavados con PBS Tween 0.1% por 8 minutos

para retirar el excedente de la leche. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo policlonal antiCyt1Aa obtenido en conejo previamente en el laboratorio con una relación 1:30,000 en el amortiguador PBS Tween 0.1% durante 2 horas en agitación lenta y constante. Seguido de esto se lavó la membrana 3 veces con PBS Tween 0.1%. Luego se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anticonejo comercial-HRP con una relación 1:20,000 en el amortiguador PBS Tween 0.1% por una 1 hora en agitación lenta y constante. Después se realizaron 2 últimos lavados con PBS Tween 0.1%. Finalmente se agregó el reactivo Luminol para western blot (Santa Cruz Biotechnology), cubriendo completamente la membrana por 1 minuto. Como último paso, se prosiguió a revelar la membrana en el fotodocumentador con un tiempo automático o en su caso 5 minutos de exposición

### Marcaje de toxinas con biotina

Para realizar las interacciones se marcaron las variantes activadas de Cyt1Aa con biotina (Sigma-Aldrich) modificada con el enlace ester N-hidroxisuccinimida (unión a los grupos amino), en una relación de 20  $\mu$ l de biotina (Stock: 25 mg/ml) por 300  $\mu$ g de toxina activada a temperatura ambiente a 514 x g por 1 hora. Posteriormente se empacó una columna por cada variante con 1.5 ml de Sephadex G25 (1 g disuelto en 4-6 ml de buffer PBS pH 10). Para equilibrar la columna se pasaron 20 ml de buffer PBS pH 10 y posteriormente se pasó la reacción de la variante con la biotina para eliminar el excedente de biotina, centrifugando a 514 x g por 2 minutos. Finalmente se recuperó la variante marcada con biotina para realizar los análisis de interacción.

### Detección de toxinas biotiniladas

Para comprobar el correcto marcaje se realizó un ensayo de detección de toxinas biotiniladas. Las toxinas marcadas se hirvieron con mezcla lítica (2% dodecilsulfato sódico (SDS), 1% B-mercaptoetanol, 50mM Tris pH 7.5, 0.025 g de Coomassie) por 5 minutos y se separaron por electroforesis en un gel de acrilamida al 15% (2.5 ml de acrilamida bisacrilamida, 1.3 ml de Tris 1M pH 8.8, 50  $\mu$ l de dodecilsulfato sódico (SDS), 50  $\mu$ l de persulfato de amonio 10 %, 1.2 ml de H<sub>2</sub>O desionizada y 3  $\mu$ l de tetrametiletilenediamina 25mM) y al 4 % (333  $\mu$ l de acrilamida bisacrilamida, 250  $\mu$ l de Tris 1M pH 6.8, 20  $\mu$ l de dodecilsulfato sódico (SDS), 25  $\mu$ l de persulfato de amonio 10%, 1.4 ml de H<sub>2</sub>O desionizada y 1.5  $\mu$ l de TEMED 25mM) en una reacción de electroforesis empleando un amortiguador de proteínas para la corrida electroforética (14.4 g de glicina, 3 g de Tris Base, 10 ml de SDS 10 % para un litro de buffer).

Las proteínas se transfirieron a una membrana de polivinil, en un cámara de transferencia con un amortiguador de transferencia (0.32 g de carbonato de sodio, 0.84 g de bicarbonato de sodio, 200 ml de metanol y aforando con H<sub>2</sub>O destilada fría a un litro), superponiendo el gel de electroforesis con la membrana a 250mA por una hora en agitación. Posteriormente la membrana se lavó 5 veces con PBS y luego con PBS Tween 2% por 30 minutos. Luego se realizaron 5 lavados con PBS Tween 0.1% dejando la membrana 8 minutos en cada uno de estos lavados.

Seguido de esto, se incubó la membrana con la estreptavidina, una proteína de origen bacteriano que tiene afinidad por la biotina la cual está acoplada a la enzima peroxidasa de rábano (HRP). La estreptavidina se empleó en una relación de 1 µl de estraptavidina por 30 ml de PBS Tween 0.1%, incubando por una hora en agitación. Tras este tiempo, se realizaron 4 lavados con PBS Tween 0.1% por 8 minutos para retirar el excedente de la estreptavidina. Posteriormente se lavó la membrana 5 veces con PBS Tween 0.1% seguido de 2 últimos lavados con PBS. Finalmente se agregó el agente Luminol para western blot (Santa Cruz Biotechnology), que que reacciona con la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario para analizar la quimioluminiscencia. El luminol se agregó a la membrana, cubriéndola completamente por 1 minuto. Como último paso, se prosiguió a revelar la reacción de quimioluminiscencia de membrana en el fotodocumentador con un tiempo automático o en su caso 5 minutos de exposición.

### Preparación de BBMV

Para obtener las BBMV se disectaron 1500-2500 larvas del 3° y 4° estadio (en conjunto) de *A. aegypti*. Se recuperó el intestino y las cicas, y éstos se lavaron y almacenaron en el amortiguador MET frío (Manitol 300 mM Mannitol, EGTA 5 mM, Tris-HCL, pH 7.4 1 M) al cual se le adiciono PMSF 1 mM y DTT 5 mM. Los intestinos y cicas se almacenaron a - 70°C hasta su procesamiento para obtener las BBMV.

Los intestinos y cicas se resuspendieron en 5 ml del amortiguador MET, y después se homogeneizaron en un homogeneizador de vidrio a 2000-3000 rpm por 35-60 segundos hasta visualizar un correcto homogeneizado de la muestra. Posteriormente se le adicionaron 4.5 ml del amortiguador MET y 500 µl de MgCl<sub>2</sub> 240 nM y se resuspendió con ayuda de un vórtex, para después dejarlos enfriar en hielo por 20 minutos. Luego se centrifugó a 3131 x g por 15 minutos, separando el pellet del sobrenadante y recuperando ambos.

Con el pellet se repitieron los pasos anteriores, dejando enfriar en hielo por 15 minutos y centrifugando a 2087 x g por 15 minutos. Ambos sobrenadantes se juntaron y centrifugaron a 100381 x g por 10 minutos.

Posteriormente el pellet se recuperó con la fracción de las vesículas de membrana media apical, resuspendiéndolo en 1 ml del amortiguador MET y haciendo alícuotas de 20 µl y almacenándolas a -70°C.

Posteriormente se realizaron los ensayos de enriquecimiento/actividad de la alcalino fosfatasa y aminopeptidasa para reconocer la presencia de estas dos proteínas de membrana que actúan como receptores de las toxinas Cry de 3 dominios de *B. thuringiensis*, e indirectamente comprobar la estabilidad de las BBMV's recuperadas.

Las proteínas de membrana se cuantificaron por Lowry (Bio Rad) para estimar indirectamente la cantidad de las BBMV's empleadas para los ensayos de unión.

### Ensayos de unión cualitativa con eritrocitos de conejo y BBMV's de larvas de *A. aegypti*

Para determinar si las variantes activadas de Cyt1Aa eran capaces de interactuar con los eritrocitos y con las vesículas de membrana media apical de *A. aegypti* se realizaron ensayos de unión cualitativa.

Los eritrocitos de conejo se lavaron 3 veces con la solución Alsever (0.1 M dextrosa, 0.07 M NaCl, 0.02 M de citrato de sodio, 0.002 M de citrato pH 7.4) y se diluyeron a una concentración de  $2 \times 10^8$  eritrocitos/ml ( $DO_{600}$  1.0-1.2) en la misma solución.

Se realizaron las interacciones en un tubo Eppendorf con eritrocitos en una reacción y con BBMV's del intestino de larvas de *A. aegypti* en otra, en una concentración de 10 µg de eritrocitos para la interacción toxina/eritrocitos y de 10 µg BBMV's para las interacciones toxina/BBMV's con 10 nM de las toxinas activadas biotiniladas y solución Alsever para las interacciones con eritrocitos y PBS pH 10 + Tween 0.1% para las interacciones con las BBMV's, en una reacción final de 100 µl, incubando a temperatura ambiente por una hora.

Como control negativo se realizó el mismo procedimiento con las toxinas biotiniladas sin presencia de eritrocitos y BBMV's de larvas de *A. aegypti*.

Una vez pasado el tiempo de incubación, las reacciones se ultracentrifugaron a 107400 x g por 10 minutos y se removió el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 100 µl de la solución Alsever/PBS pH 10 + Tween 0.1%, centrifugando de nuevo a 16873 x g por 10 minutos. Este último paso de lavado se repitió dos veces más.

Posteriormente, el pellet (toxinas unidas a BBMV/eritrocitos) se resuspendió en 10 µl de Alsever/PBS pH 10, hirviendo con mezcla lítica por 5 minutos, y después se realizó la electroforesis en un gel de acrilamida al 15% (2.5 ml de acrilamida bisacrilamida, 1.3 ml de Tris 1M pH 8.8, 50 µl de dodecilsulfato sódico (SDS), 50 µl de persulfato de amonio 10 %, 1.2 ml de H<sub>2</sub>O desionizada y 3 µl de tetrametiletilenediamina TEMED 25mM) y al 4 % (333 µl de acrilamida bisacrilamida, 250 µl de Tris 1M pH 6.8, 20 µl de dodecilsulfato sódico (SDS), 25 µl de persulfato de amonio 10%, 1.4 ml de H<sub>2</sub>O desionizada y 1.5 µl de tetrametiletilenediamina (TEMED) 25mM) empleando un amortiguador de proteínas (14.4 g de glicina, 3 g de Tris Base, 10 ml de SDS 10 % para un litro de buffer).

Las proteínas se transfirieron a una membrana de polivinil, en un cámara de transferencia con Buffer de Transferencia (0.32 g de carbonato de sodio, 0.84 g de bicarbonato de sodio, 200 ml de metanol y aforando con H<sub>2</sub>O destilada fría a un litro), superponiendo el gel de electroforesis con la membrana, transfiriendo por 90 minutos a 350mA. Posteriormente la membrana se lavó 5 veces con PBS y luego con PBS Tween 2% por 30 minutos para realizar el bloqueo de la membrana. Luego se realizaron 5 lavados con PBS Tween 0.1% dejando la membrana 8 minutos en cada uno de estos lavados.

Seguido de esto, se incubó la membrana con la estreptavidina (1 µl de estreptavidina por 30 ml de PBS Tween 0.1%) por una hora en agitación. Tras este tiempo, se realizaron 4 lavados con PBS Tween 0.1% por 8 minutos para retirar el excedente de la estreptavidina. Posteriormente se lavó la membrana 5 veces con PBS Tween 1% seguido de 2 últimos lavados con PBS. Finalmente se agregó el reactivo Luminol para western blot (Santa Cruz Biotechnology), cubriendo completamente la membrana por 1 minuto. Como último paso, se prosiguió a revelar la membrana en el fotodocumentador con un tiempo automático o en su caso 6 minutos de exposición.

### Oligomerización en BBMV de larvas del mosquito *A. aegypti*

Para evaluar si las variantes de Cyt1Aa A65C, L85C y N89C afectadas en toxicidad contra larvas de *A. aegypti* presentaban una afectación en su capacidad de formar oligómeros se realizó el ensayo de oligomerización en presencia de BBMV aisladas de larvas del 3 y 4 estadio de *A. aegypti*.



Se realizaron las interacciones en un tubo Eppendorf con 10 µg de BBMV de larvas de *A. aegypti*, 10 ng de tripsina (activación de toxina), 200 ng de las protoxinas de las variantes de Cyt1Aa A65C, L85C y N89C en una reacción final de 100 µl de amortiguador de carbonatos pH 10.2, incubando a 25°C por 1 hora.

Una vez pasado el tiempo de incubación, se agregó PSMF 1 mM para detener la reacción de tripsinización y las reacciones se ultracentrifugaron a 107400 x g por 20 minutos. El sobrenadante y el pellet se separaron, agregándoles el amortiguador laminli y calentando las muestras a 50°C por 3 minutos.

Después se realizó una corrida electroforética de las muestras del sobrenadante (toxina libre) y pellet (toxinas unidas a BBMV) en un gel de acrilamida al 15% (2.5 ml de acrilamida bisacrilamida, 1.3 ml de Tris 1M pH 8.8, 50 µl de dodecilsulfato sódico (SDS), 50 µl de persulfato de amonio 10 %, 1.2 ml de H<sub>2</sub>O desionizada y 3 µl de tetrametiletilenediamina TEMED (Sigma) y al 4 % (333 µl de acrilamida bisacrilamida, 250 µl de Tris 1M pH 6.8, 20 µl de dodecilsulfato sódico (SDS), 25 µl de persulfato de amonio al 10%, 1.4 ml de H<sub>2</sub>O desionizada y 1.5 µl de tetrametiletilenediamina (TEMED) a 25mM en un amortiguador de proteínas (14.4 g de glicina, 3 g de Tris Base, 10 ml de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10 % para un litro de buffer).

Las fracciones de pellet y sobrenadante se transfirieron a una membrana de polivinil, en un cámara de transferencia con Buffer de Transferencia (0.32 g de carbonato de sodio, 0.84 g de bicarbonato de sodio, 200 ml de metanol y aforando con H<sub>2</sub>O destilada fría a un litro), superponiendo el gel de electroforesis con la membrana, transfiriendo por 90 minutos a 350mA. Posteriormente la membrana se lavó 5 veces con PBS y luego con PBS Tween 2% por 30 minutos para realizar el bloqueo. Luego se realizaron 5 lavados con PBS Tween 0.1% dejando la membrana 8 minutos en cada uno de estos lavados.

Seguido de esto, se bloqueó la membrana con leche descremada al 5% en el amortiguador PBS Tween 0.1% a 4°C durante 2 horas en agitación lenta y constante. Tras este tiempo, se realizaron 2 lavados con PBS Tween 0.1% por 8 minutos para retirar el excedente de la leche. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo primario policlonal antiCyt1Aa obtenido en el laboratorio en una relación 1:70,000 en el amortiguador PBS Tween 0.1% durante 1 hora en agitación lenta y constante. Seguido de esto se lavó la membrana 3 veces con PBS Tween 0.1%. Luego se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anticonejo comercial-HRP en una relación 1:10,000 en el amortiguador PBS Tween 0.1% por una 1 hora en agitación lenta y constante. Después se realizaron 2 últimos lavados con PBS Tween 0.1%. Finalmente se agregó el reactivo Luminol para western blot (Santa Cruz Biotechnology), cubriendo completamente la membrana por 1 minuto. Como último paso, se prosiguió a revelar la membrana en el fotodocumentador con un tiempo automático o en su caso 5 minutos de exposición.

## Ensayos de unión a lípidos de membrana (Membrane Lipid Strips)

Para evaluar si existía una interacción particular por lípidos de membrana, se realizaron en ensayos de unión a lípidos de membrana acoplados a una membrana hidrofóbica adquiridos comercialmente de Echelon.

Estas membranas contienen una concentración de 200 pmol por punto de 15 diferentes lípidos de membrana (triglicérido, diacilglicerol (DAG), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina, fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositol 4 fosfato (PtdIns(4)P), fosfatidilinositol 4,5 fosfato (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>), fosfatidilinositol 3,4,5 fosfato (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>), colesterol, esfingomielina y 3-sulfogalactosilceramida (sulfatido).

Para este ensayo se siguió el protocolo del fabricante (Echelon PI(4,5)P<sub>2</sub> Grip<sup>MR</sup>, G-4501) con algunas modificaciones.

Las membranas de lípidos de membrana se bloquearon 6 horas con una solución de bloqueo (PBS-Tween 0.1% + 1% de leche) y posteriormente se incubó toda la noche con las variantes de Cyt1Aa evaluadas en una concentración de 1.2 µg/ml y 5 µg/ml en la solución de bloqueo a 4°C y agitación débil y constante.

Luego se realizaron 3 lavados con amortiguador PBS- Tween 0.1% de 10 minutos cada uno. Seguido de esto se incubó con el anticuerpo primario antiCyt1Aa en una relación 1:30,000 por 2 horas en la solución de bloqueo. Posteriormente se realizaron 3 lavados con amortiguador PBS- Tween 0.1%. Después se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo en una relación 1:20,000 por 1 hora en la solución de bloqueo y se realizaron 3 lavados con amortiguador PBS Tween 0.1%.

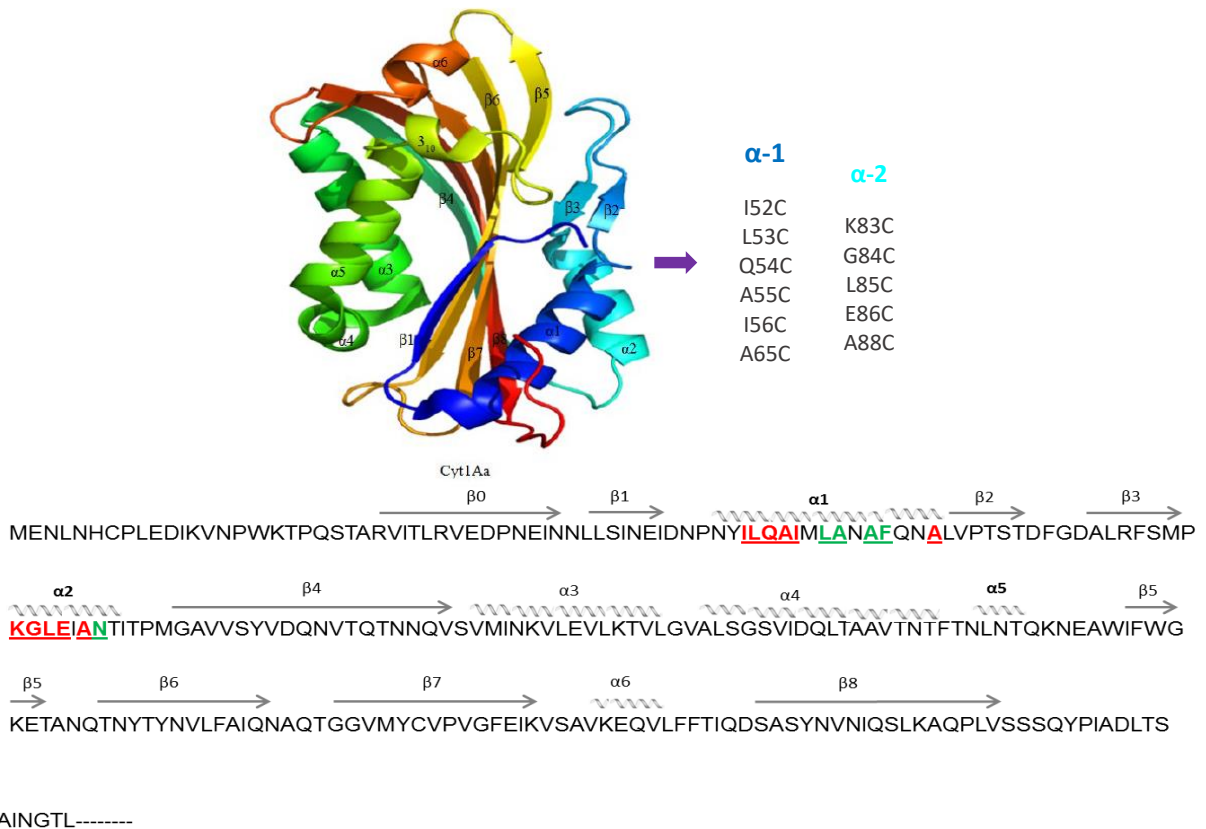
Finalmente se agregó el reactivo Luminol para western blot (Santa Cruz Biotechnology), cubriendo completamente la membrana por 1 minuto. Como último paso, se prosiguió a revelar la membrana en el fotodocumentador con un tiempo automático o en su caso 6 minutos de exposición.

Como control positivo se empleó el receptor del dominio proteico de PLC-δ1 PH recombinante acoplado a GST proporcionado con las membranas de lípidos, el cual se une al fosfoinositósido PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> detectado con un anticuerpo anti-GST.

## RESULTADOS

### Mutagénesis dirigida

Con la finalidad de reconocer el papel de las hélices  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 de la toxina Cyt1Aa en la especificidad de la toxina Cyt1Aa, se realizó la mutagénesis dirigida introduciendo cambios puntuales en las bases que codifican para los aminoácidos I52, L53, Q54, A55, I56, A65 en la hélice  $\alpha$ -1 y los aminoácidos K83, G84, L85, E86 y A88 en la hélice  $\alpha$ -2 de *cyt1Aa* sustituyéndolos por las bases que codifican para cisteínas (codón preferencial TGT). El cambio a cisteínas se realizó para contar con estas variantes de Cyt1Aa para el marcaje de cisteínas con un fluoróforo y poder analizar su dinámica de unión a diferentes tipos de membrana (eritrocitos/BBMV/membranas sintéticas) a través de fluorescencia en otros proyectos de investigación desarrollándose en el laboratorio (ver figura 12).



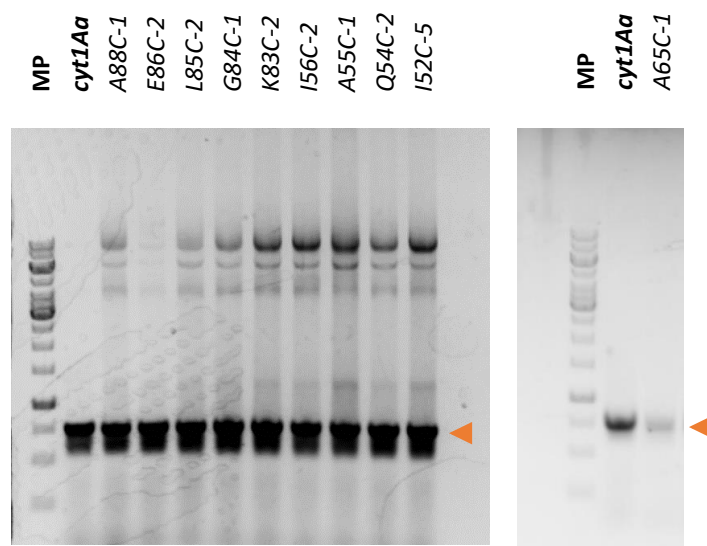
**Figura 12. Análisis de mutagénesis dirigida en Cyt1Aa.** Los aminoácidos marcados en rojo representan los aminoácidos que serán sustituidos por una cisteína las hélices  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 de Cyt1Aa. Los aminoácidos marcados en verde representan los aminoácidos que fueron sustituidos en trabajos anteriores en las hélices  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 de Cyt1Aa. Cyt1Aa: 249 aa/ 27kDa. Imagen de la estructura cristalográfica de Cyt1Aa modificada de Xu *et al.*, 2014.

Para la mutagénesis se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos específicos para cada mutante. Dichas mutantes se generaron empleando el paquete comercial QuickChange XL® Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) (ver tabla 1). Los productos de PCR que contenían las mutantes deseadas en *cyt1A* se digirieron con la endonucleasa Dpn1 que digiere adeninas metiladas, descartando así el ADN parental, para después purificarlos.

Posteriormente se transformó con los diferentes productos de PCR en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ , y luego se purificaron estos plásmidos de algunas de las colonias obtenidas. Tras esto se analizó la amplificación de *cyt1Aa* y las mutantes con una reacción de PCR, seguido de una comprobación por secuenciación de estos plásmidos positivos para cada una de las mutantes. Los resultados de la secuenciación corroboraron la sustitución de las bases que codifican para los codones de los aminoácidos seleccionados en la hélice  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 por las bases que codifican para el codón preferencial TGT de cisteína en los plásmidos obtenidos de las colonias analizadas.

Una vez obtenida la comprobación de estas mutantes, se transformó con estos plásmidos en la cepa de *E. coli* SCS110 (*Dcm*-), se purificaron estos plásmidos y se analizó la amplificación de *cyt1Aa* y las mutantes por una reacción de PCR. Después de esto se prosiguió a transformar las células de *Bacillus thuringiensis* (*Bt* -407 acristalífera) con los plásmidos correspondientes.

Tras obtener las mutantes en *B. thuringiensis*, se amplificó el gen *cyt1Aa* y las mutantes por una reacción de PCR, y a partir de ellas se realizó una segunda comprobación de la correcta mutagénesis por secuenciación para cerciorar la correcta sustitución de las bases de los aminoácidos I52, L53, Q54, A55, I56, A65 en la hélice  $\alpha$ -1 de, y de los aminoácidos K83, G84, L85, E86 y A88 en la hélice  $\alpha$ -2 de *Cyt1Aa* y proseguir con la caracterización de estas mutantes (ver figura 13).



**Figura 13. Comprobación de la amplificación de *cyt1Aa* y mutantes.** Amplificación del gen *cyt1Aa* y mutantes en una reacción de PCR empleando los oligonucleótidos Cyt1AaF y Cyt1AaR (sintetizados previamente en el laboratorio) mostrada en un gel de agarosa al 2% para comprobar la amplificación del gen de *cyt1Aa* y las mutantes en *Bacillus thuringiensis* 407-(tamaño de 700 pb) (◀).

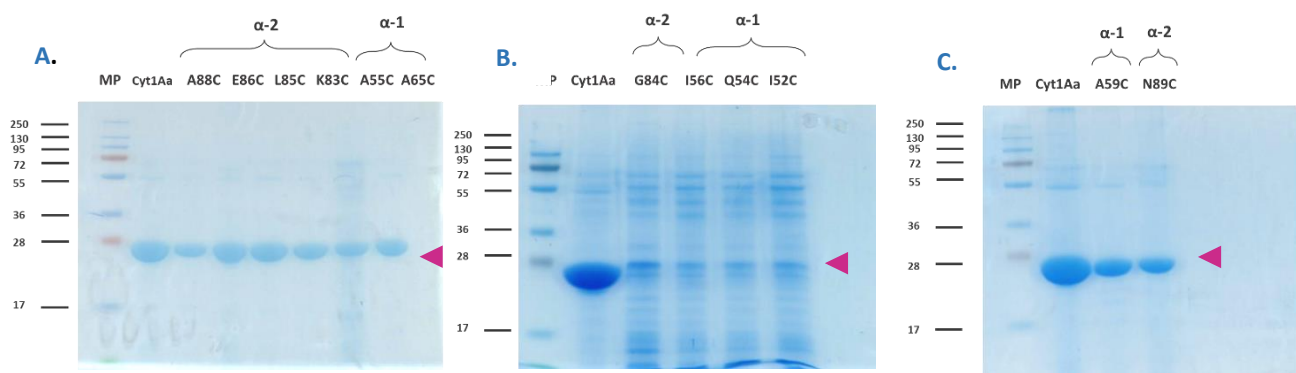
Los resultados de la secuenciación fueron positivos confirmando la obtención de 10 mutantes: 5 mutantes en la hélice  $\alpha$ -1, *cyt1Aa:I52C*, *cyt1Aa:Q54C*, *cyt1Aa:A55C*, *cyt1Aa:I56C*, *cyt1Aa:A65C*, y 5 mutantes en la hélice  $\alpha$ -2, *cyt1Aa:K83C*, *cyt1Aa:G84C*, *cyt1Aa:L85C*, *cyt1Aa:E86C* y *cyt1Aa:A88C*, las cuales fueron caracterizadas, junto con las mutantes *cyt1Aa:A59C* y *cyt1Aa:N89C* obtenidas previamente. Pese a varios intentos la mutante *cyt1Aa:L53C* no pudo ser obtenida.

Durante el desarrollo de este proyecto, la Dra. Janette Onofre obtuvo la mutante *cyt1Aa:N89C* en la hélice  $\alpha$ -2 de Cyt1Aa, quién se está realizando mutantes puntuales en varios sitios de Cyt1Aa con la finalidad de determinar cómo esta toxina se inserta en la membrana a través de ensayos de fluorescencia. Junto con esta mutante también se caracterizó la mutante *cyt1Aa:A59C* en la hélice  $\alpha$ -1 de Cyt1Aa que obtuvo la M. en C. Jazmin López durante su proyecto de maestría en donde realizó mutagénesis dirigida en *cyt1Aa*, determinando que la variante A59C es tóxica contra larvas del mosquito *A. aegypti* pero no es tóxica en eritrocitos de conejo (Bravo et al., 2018).

## Ensayos de solubilización y activación de toxinas

Para evaluar la expresión y estabilidad de las variantes de Cyt1Aa se purificaron los cristales proteicos de las respectivas cepas mutantes expresadas en *B. thuringiensis* para continuar con su caracterización.

Una vez obtenidas las mutantes en *cyt1Aa*, se purificaron los cristales proteicos de las variantes de Cyt1Aa I52C, Q54C, A55C, I56C, A65C, K83C, G84C, L85C, E86C y A88C expresadas en *B. thuringiensis* obtenidas en este trabajo, así como de aquellas obtenidas previamente, las variantes A59C y N89C expresadas en *B. thuringiensis* que corresponden a las proteínas observadas con un peso de 27kDa (ver figura 14).



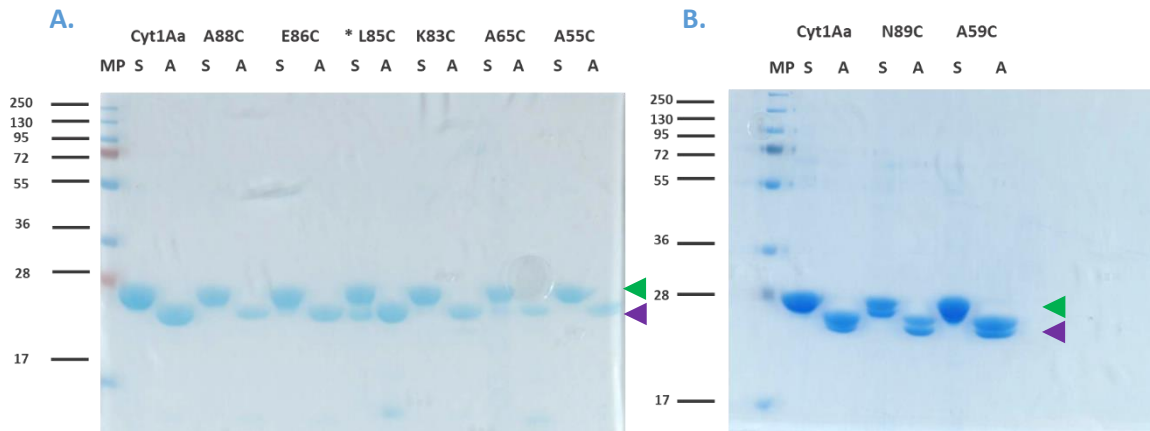
**Figura 14 Expresión de variantes de Cyt1Aa en solución espora cristal.** Purificación de los cristales proteicos (solución espora-cristal) de las variantes de Cyt1Aa observadas en un gel SDS-PAGE al 15%. Se puede observar una banda de 27 kDa (◄) que corresponde a la protoxina Cyt1Aa y a las variantes de Cyt1Aa (A: A88C, E86C, L85C, K83C y A55C, B: G84C, I56C, Q54C y I52C y C: A59C y N89C).

Las variantes de Cyt1Aa, G84C, I56C, Q54C y I52C muestran una disminución significativa de la expresión en *B. thuringiensis* en relación con el control positivo (Cyt1Aa-figura 14B) por lo que decidimos no continuar con su caracterización debido a su baja expresión (ver figura 14B). Para descartar posibles errores en el proceso de purificación de los cristales proteicos se realizaron 2 purificaciones de estas variantes con la misma metodología, así como una tercera vez incorporando un paso previo de lavado con agua ácida (pH 4).

Las variantes de Cyt1Aa N89C, A88C, E86C, L85C, K83C, A59C y A55C tuvieron una correcta expresión en *B. thuringiensis*, por lo que se continuo con su caracterización (ver figura 14A y 14C).

Posteriormente se realizaron los ensayos de solubilización de los cristales de las variantes de Cyt1Aa en un amortiguador de carbonatos, emulando la solubilización de las toxinas en el intestino de las larvas de *A. aegypti* para la obtención de las protoxinas variantes de Cyt1Aa. En el caso específico de la variante L85C se tuvieron que ajustar las condiciones de solubilización modificando el amortiguador de carbonatos por NaOH 50 mm debido a la inestabilidad que presenta esta proteína. Las variantes de Cyt1Aa obtenidas mostraron una correcta solubilización, continuando así con el proceso de activación de éstas (ver figura 15A y 15B).

Una vez solubilizadas, las protoxinas N89C, A88C, E86C, L85C, K83C, A65C, A59C y A55C se activaron con tripsina en una relación 1:50 tripsina-protoxina para así obtener las variantes activadas de Cyt1Aa con efecto tóxico (ver figura 15A y 15B).

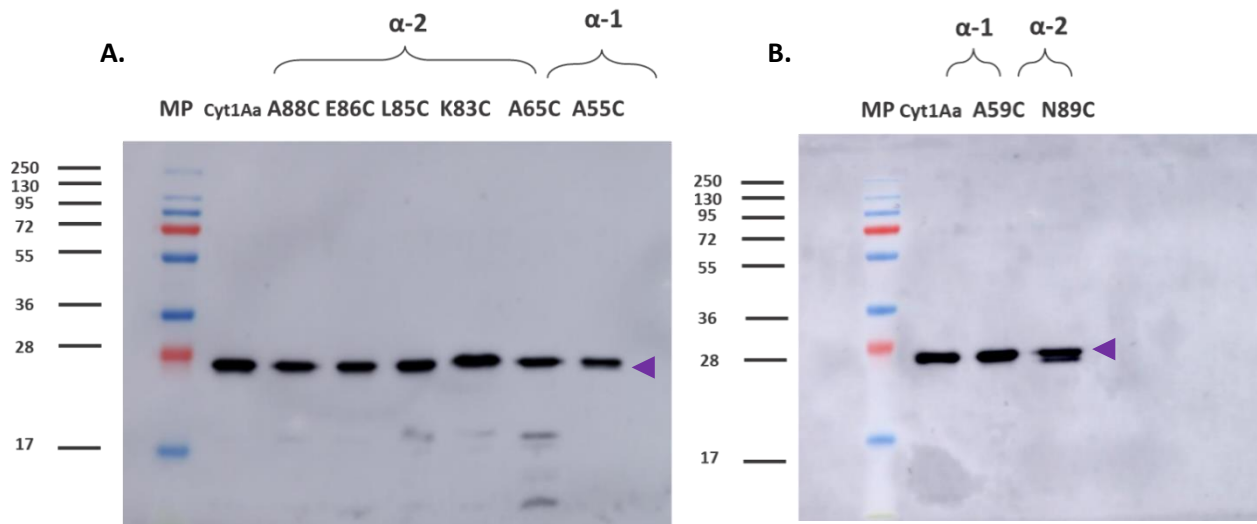


**Figura 15. Solubilización y activación de las protoxinas variantes de Cyt1Aa.** **A.** Variantes de Cyt1Aa A88C, E86C, L85C, K83C, A65C y A55C. **B.** Variantes de Cyt1Aa N89C y A59C. Se puede observar bandas de 27 kDa (◀) que corresponden a las protoxinas y bandas de 24 kDa (◀) que corresponde a las toxinas activadas observadas en un gel SDS-PAGE al 15%. **S:** protoxina solubilizada en carbonatos, 2 horas a 37°C. La variante \*L85C se solubilizó en NaOH 50mM, 2 horas a 4°C. **A:** toxina activada con tripsina 1:50 tripsina: protoxina por 1 hora a 37°C. La variante L85C se activó 1 hora a 4°C.

Como se observa en el ensayo de solubilización y activación, las bandas con un peso aproximado de 27 kDa que corresponden a las protoxinas solubilizadas de las variantes de Cyt1Aa, N89C, A88C, E86C, L85C, K83C, A65C, A59C y A55C, así como las bandas con un peso aproximado de 24 kDa que corresponden a las variantes activadas de Cyt1Aa A88C, E86C, L85C, K83C, A65C y A55C con tripsina en una relación de 1:50

tripsina:protoxina. En resumen, todas las variantes de Cyt1Aa obtenidas en este trabajo muestran una correcta solubilización y activación con tripsina (ver figura 15A y 15B).

Para corroborar que las proteínas obtenidas eran variantes activadas de Cyt1Aa, se realizó un ensayo de expresión cualitativa de tipo western blot empleando el anticuerpo anti Cyt1Aa en ratón generado previamente en el laboratorio (ver figura 16).



**Figura 16. Western blot de las variantes de Cyt1Aa.** A. Detección de variantes activadas de Cyt1Aa A88C, E86C, L85C, K83C, A55C y A65C. B. Detección de variantes activadas de Cyt1Aa A59C y N89C. Reconocimiento con anticuerpo anti-Cyt1Aa generado en conejo. La detección de las toxinas activadas se muestra en el peso que corresponde a 24kDa (◀) observadas en un gel SDS-PAGE al 15% y transferida a una membrana de polivinil.

Con el ensayo de western blot se corroboró que las toxinas obtenidas en el proceso de mutagénesis dirigida en *cyt1Aa*, son variantes de la toxina Cyt1Aa de *B. thuringiensis* (ver figura 16).



## Actividad tóxica en larvas de mosquito *A. aegypti* y *M. sexta*

Para continuar con la caracterización de las variantes de Cyt1Aa obtenidas en este trabajo, A88C, E86C, L85C, K83C en la hélice  $\alpha$ -2 y A65C y A55C en la hélice  $\alpha$ -1, así como de las variantes de Cyt1Aa obtenidas previamente, A59C y N89C, se evaluó su toxicidad a través de un bioensayo en larvas del 4º estadio del mosquito *A. aegypti*.

Para evaluar el efecto tóxico de las variantes de Cyt1Aa obtenidas, se evaluó la mortalidad de una población de 30 larvas tras 24 horas de intoxicación con las toxinas, empleando un rango de concentración de 20 - 3000 ng/ml de las variantes de Cyt1Aa, y con los datos obtenidos, se calculó la dosis letal media LC<sub>50</sub> de cada una de las variantes de Cyt1Aa, es decir la concentración que se requiere de la toxina para matar a la mitad de la población del organismo blanco (ver tabla 5).



Región	Variante	Dosis letal media LC <sub>50</sub> (ng/ml)
	<b>Cyt1Aa silvestre</b>	256 (200 ± 312) <sup>a</sup>
	<b>N89C</b>	>2500
<b><math>\alpha</math>-2</b>	<b>A88C</b>	92 (64 ± 129) <sup>a</sup>
	<b>E86C</b>	334 (219 ± 445) <sup>a</sup>
	<b>L85C</b>	> 3000
	<b>K83C</b>	233 (118 ± 343) <sup>a</sup>
	<b>A65C</b>	>3000
<b><math>\alpha</math>-1</b>	<b>A59C</b>	1531 (1332 ± 1724) <sup>a</sup>
	<b>A55C</b>	619 (486 ± 782) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> 95% en límites de confianza calculados con Probit

**Tabla 5. Determinación de dosis letal media (LC<sub>50</sub>) de las variantes de Cyt1Aa en larvas de *A. aegypti*.** Se probaron ocho concentraciones (rango 20-3500 ng/ml) y se analizó la mortalidad tras 24 horas de observación en una n poblacional de 30 larvas del 4to estadio de *A. aegypti*. Los cálculos de la dosis letal media se obtuvieron en el programa PoloPlus. Para más detalles de la determinación de la dosis letal media (LC<sub>50</sub>) revisar **tabla 7**. Los resultados muestran los datos obtenidos de 1 réplica biológica con 3 réplicas experimentales cada una.

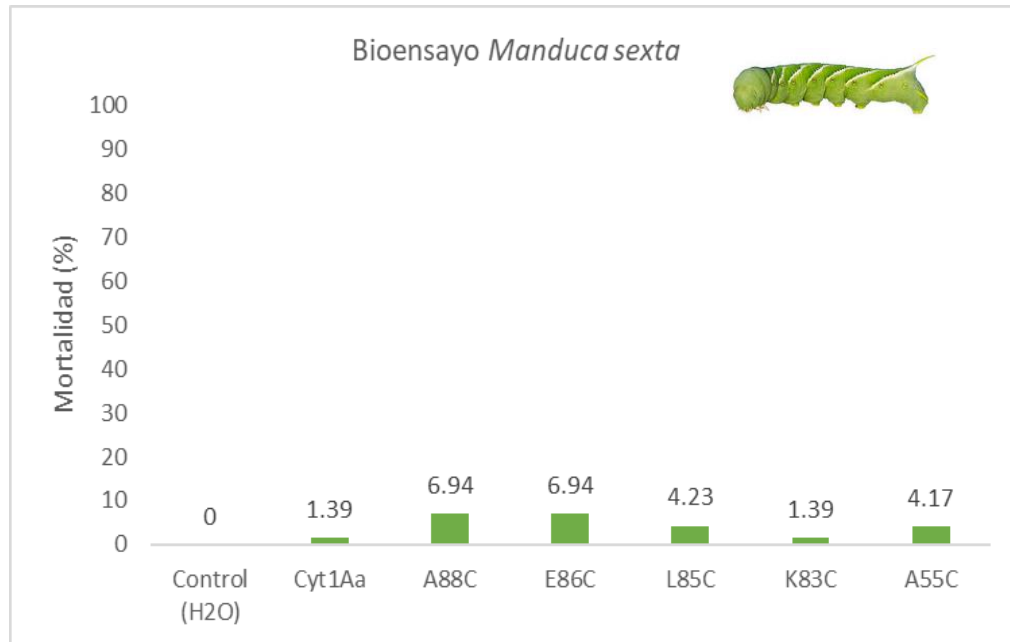
Estos datos demuestran que las variantes de Cyt1Aa N89C, L85C y A65C pierden su toxicidad contra larvas de *A. aegypti* ya que la concentración de toxina empleada (>2500 ng/ml) sobrepasa a la empleada de la toxina Cyt1Aa silvestre. Por el contrario, las variantes A88C, E86C, K83C, A59C y A55C siguen siendo tóxicas contra larvas de *A. aegypti* ya que las dosis letales medias estimadas son similares a las observadas en los ensayos con la toxina silvestre Cyt1Aa (ver tabla 5).

Este ensayo comprueba además que la variante N89C pierde su toxicidad contra larvas de *A. aegypti* mientras que la variante A59C sigue siendo tóxica contra larvas de *A. aegypti* (ver tabla 5).

Se realizó un análisis estadístico con los datos obtenidos en el bioensayo de toxicidad en larvas de mosquitos de *A. aegypti*, evaluando el fenómeno de toxicidad de estas variantes de Cyt1Aa a una concentración de 200 ng/ml. Con este análisis estadístico se observó que la variante de Cyt1Aa A88C incrementó su toxicidad significativamente con respecto a las otras variantes (ANOVA,  $p= 0.05$ ), mientras que las variantes E86C, K83C, A59C y A55C muestran una toxicidad similar al de la toxina Cyt1Aa silvestre (datos no mostrados).

Con los resultados de toxicidad en larvas de *A. aegypti* de las variantes de Cyt1Aa, surgió la pregunta si estas variantes podrían haber ganado toxicidad hacia otros organismos, en este caso un lepidóptero como *Manduca sexta*, un organismo modelo del estudio de la toxicidad de las toxinas Cry de 3 dominios. Esto se propuso con base a resultados previos, en donde se había observado que las variantes de Cyt1Aa A59C y A61C eran tóxicas contra el coleóptero plaga del maíz, *Diabrotica virgifera virgifera* (Bravo *et al.*, 2018).

Para responder a la pregunta anterior, se realizó un bioensayo en larvas del 1° estadio del lepidóptero *M. sexta*, evaluando el efecto tóxico de las variantes de Cyt1Aa (A88C, E86C, L85C, K83C y A55C) en una concentración letal de 1000 ng/ml tras 7 días de intoxicación. La variante A65C no se probó en este ensayo ya que en el momento de su realización aún no se contaba con dicha variante.

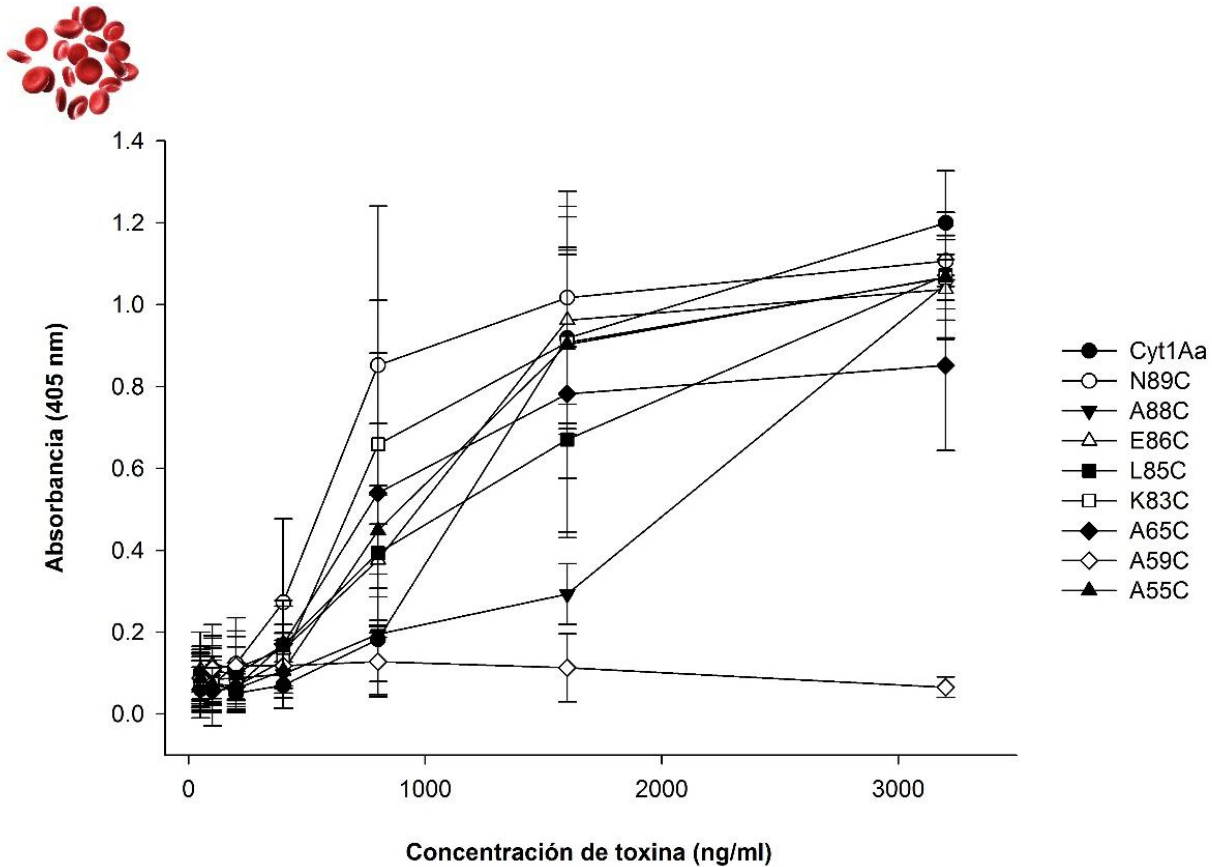


**Figura 17. Bioensayo de las variantes de Cyt1Aa en larvas del 1ºestadio de *M. sexta*.** Se probó una sola concentración: una dosis alta (1000 ng/ cm<sup>2</sup>) y se evaluó tras 168 horas (7 días). Los resultados muestran el promedio de 1 réplica biológica con 3 réplicas experimentales cada una.

Como se muestra en este bioensayo en larvas de *M. sexta*, la modificación de aminoácidos en la región de las hélices  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 no promueve la toxicidad hacia larvas de organismos no blanco de la toxina Cyt1Aa, ya que ninguna de las variantes de Cyt1Aa presentó toxicidad hacia *M. sexta* (ver figura 17).

## Actividad hemolítica en eritrocitos de conejo

Para continuar con la caracterización de las variantes de Cyt1Aa obtenidas en este trabajo, A88C, E86C, L85C, K83C, A65C y A55C, así como de las variantes de Cyt1Aa obtenidas previamente, A59C y N89C, se evaluó la actividad hemolítica en eritrocitos de conejo empleando 6 concentraciones (50, 100, 200, 400, 800, 1600 y 3200 ng/ml) de las variantes de Cyt1Aa activadas



**Figura 18. Ensayo de hemólisis de las variantes de Cyt1Aa en eritrocitos de conejo.** Se evaluó el comportamiento hemolítico de las variantes A55C, A59C, A65C, K83C, L85C, E86C, A88C y N89C en un rango de concentraciones de 50 – 3200 ng/ml de estas toxinas. Los resultados mostrados en la gráfica representan el promedio de 4 réplicas biológicas con 3 réplicas experimentales cada una.

A partir de los datos obtenidos en el ensayo de hemólisis se calcularon los valores de dosis efectiva media ( $DE_{50}$ ) de estas variantes de Cyt1Aa que se muestran a continuación (ver tabla 6).

Región	Toxina	DE <sub>50</sub> (ng/ml)
	Cyt1Aa	1297 (1293 – 1301.29) <sup>a</sup>
<b>α-1</b>	A55C	813 (806 – 821) <sup>a</sup>
	A59C	>5000
	A65C	758 (740 – 780) <sup>a</sup>
<b>α-2</b>	K83C	709 (702 – 718) <sup>a</sup>
	L85C	836 (825 – 851) <sup>a</sup>
	E86C	823 (816 – 831) <sup>a</sup>
	A88C	1626 (1619 – 1633) <sup>a</sup>
	N89C	186 (169 – 208) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> 95% en límites de confianza

**Tabla 6. Determinación de dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>) de las variantes de Cyt1Aa en eritrocitos.** Se obtuvieron los valores de dosis efectiva media con los datos obtenidos en los ensayos de hemólisis de las variantes de Cyt1Aa en las diferentes concentraciones evaluadas (50 – 3200 ng/ml).

Estos resultados confirman que la variante de Cyt1Aa N89C obtenida previamente es hemolítica (DE<sub>50</sub> 186 ng/ml) mientras que la variante A59C pierde su actividad hemolítica por completo (DE<sub>50</sub> >5000 ng/ml) (ver figura 18 y tabla 6).

En cuanto a las variantes de Cyt1Aa obtenidas en este trabajo, se pudo determinar que las variantes Cyt1Aa E86C, L85C, K83C, A65C y A55C siguen preservando su actividad hemolítica en eritrocitos al contrario de la

variante A88C en la hélice  $\alpha$ -2 que presentan una disminución de su actividad hemolítica en eritrocitos de conejo (DE<sub>50</sub>: 1626 ng/ml) (ver figura 18 y tabla 6).

Los datos de la actividad hemolítica de las variantes de Cyt1Aa en eritrocitos de conejo se analizaron con una prueba ANOVA con una  $p=0.05$  para evaluar el comportamiento hemolítico de todas las variantes de Cyt1Aa obtenidas en este trabajo en una concentración de 1600 ng/ml de las toxinas, cuyos resultados arrojaron que la variante de Cyt1Aa A59C (DE<sub>50</sub>: >5000 ng/ml) fue significativamente menos hemolítica que el resto de las variantes de Cyt1Aa. Por el contrario, la variante N89C mostró ser significativamente más hemolítica (DE<sub>50</sub>: 186 ng/ml) que las variantes L85C (DE<sub>50</sub>: 836 ng/ml) y A88C (DE<sub>50</sub>: 1626 ng/ml) en esta concentración. El resto de las variantes mostró un fenómeno de actividad hemolítica similar al de la toxina Cyt1Aa.

### Caracterización de toxinas afectadas en toxicidad

Los resultados obtenidos en el bioensayo de la actividad tóxica en larvas de *A. aegypti* y los ensayos de hemólisis en eritrocitos de conejo, proponen que existe una especificidad de la toxina Cyt1Aa con el tipo celular, y que la región estructural involucrada en ello comprende a las hélices  $\alpha$  - 1 y  $\alpha$  - 2 de la toxina Cyt1Aa, ya que podemos separar tanto la toxicidad a larvas de *A. aegypti* como a eritrocitos de conejo por mutaciones puntuales en ambas hélices como se observa en las variantes no tóxicas a larvas de *A. aegypti* A65C, L85C y N89C, así como las variantes no hemolíticas A59C y A88C.

A partir de esta premisa, y para reconocer si estas variantes de Cyt1Aa afectadas en especificidad (afectación en actividad hemolítica o tóxica a larvas de *A. aegypti*) presentan una afectación en la unión con la membrana tanto del intestino de las larvas del *A. aegypti*, como con las membranas de los eritrocitos, se propusieron ensayos de interacción cualitativa con BBMV (del inglés brush border membranes vesicles) y con eritrocitos de conejo.

Como un paso posterior se realizaron ensayos de oligomerización de las variantes de Cyt1Aa afectadas en toxicidad hacia larvas de *A. aegypti*, para determinar si éstas son capaces de formar estructuras oligoméricas en presencia de BBMV purificadas de larvas de *A. aegypti*.

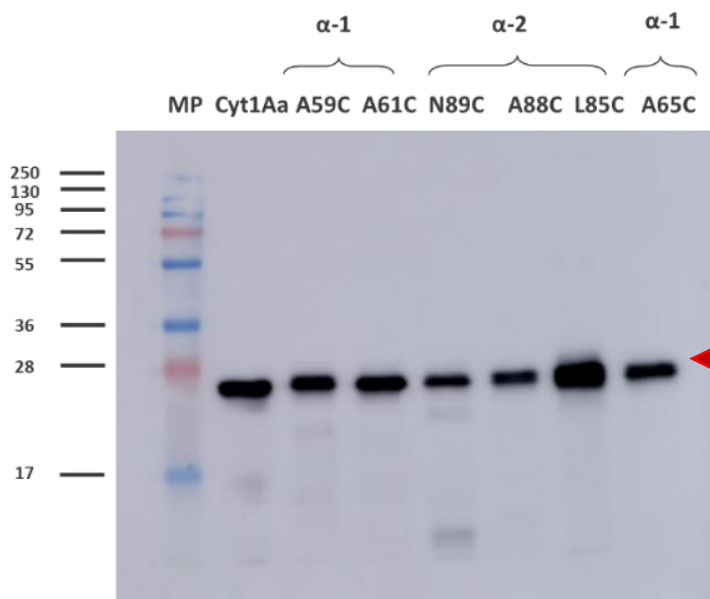
Junto con esto, se realizaron ensayos de lipid dot blot, para reconocer si existe un reconocimiento diferencial de las variantes de Cyt1Aa afectadas en toxicidad (afectación en actividad hemolítica o tóxicas a larvas de *A. aegypti*) por lípidos de membrana particulares de origen comercial (Membrane Lipid Strips-Echelon).

## Ensayos de unión

### I. Marcaje de toxinas activadas con biotina

Inicialmente comenzamos con el marcaje de las variantes de Cyt1Aa N89C, A88C y L85C en la hélice  $\alpha$ -2, y A65C y A59C en la hélice  $\alpha$ -1, que presentan una afectación en la actividad tóxica a larvas de *A. aegypti* o a eritrocitos de conejo, con biotina para poder realizar los ensayos de interacción y detectar por ensayos de unión con eritrocitos y con BBMV de larvas de *A. aegypti* si existe una afectación en este paso del mecanismo de acción de este tipo de toxinas.

Primero comenzamos con la detección del correcto marcaje de estas variantes de Cyt1Aa, para así poder continuar con los ensayos de unión con eritrocitos de conejo y con BBMV de larvas de *A. aegypti*.



**Figura 19. Detección de toxinas biotiniladas.** Se detectaron las variantes de Cyt1Aa A59C, A61C, N89C, A88C, L85C, A65C biotiniladas vistas en una membrana de polivinil. También se muestra el marcaje con biotina de la toxina A61C que se empleó para otros fines. Para este ensayo se detectaron las toxinas marcadas con biotina a través de la interacción biotina- estreptavidina (◄).

Como se puede observar, todas las variantes de Cyt1Aa afectadas en especificidad (afectación en actividad hemolítica o tóxica a larvas de *A. aegypti*) muestran un correcto marcaje con biotina, lo que nos permitió

continuar con los ensayos de interacción con eritrocitos de conejo y con BBMV de larvas de *A. aegypti* (ver figura 19).

## II. Ensayo de unión a eritrocitos

Para analizar la interacción de las variantes de Cyt1Aa con eritrocitos, propusimos realizar un ensayo de unión cualitativa de estas variantes, con la finalidad de reconocer si la afectación de la actividad hemolítica de las variantes no hemolíticas se debe a una pérdida en la capacidad de interacción con eritrocitos.

Las variantes de Cyt1Aa, A88C en la hélice  $\alpha$ -2 y A59C en la hélice  $\alpha$ -1 perdieron su actividad hemolítica en eritrocitos de conejo en experimentos *in vitro*, sin embargo, estas variantes aún son tóxicas contra larvas del mosquito *A. aegypti* confirmando que existe un reconocimiento diferencial entre los tipos celulares.

Para analizar si el paso de unión a la membrana de eritrocitos es limitante en las variantes no hemolíticas, se propuso realizar un ensayo de unión cualitativa en eritrocitos de conejo empleando tanto las variantes no hemolíticas A59C y A88C, como las variantes no tóxicas a larvas de *A. aegypti*, A65C L85C y N89C, realizando varias aproximaciones y condiciones, entre ellas las siguientes:

### Experimento 1

Las interacciones con eritrocitos se realizaron con las variantes de Cyt1Aa activadas por proteasas y se detectaron con el anticuerpo anti-Cyt1Aa, sin embargo, el anticuerpo detecta de manera inespecífica proteínas de los eritrocitos por lo que la interpretación de unión no fue posible.

### Experimento 2

Las interacciones con eritrocitos se realizaron con las variantes de Cyt1Aa activadas por proteasas biotiniladas en un rango de pH de 8 – 10, sin embargo, las variantes mostraban precipitación en el amortiguador empleado para las interacciones (solución Alsever pH 10). El protocolo de marcaje de biotina se recomienda a un pH de 8 según el protocolo, pero se optó por probar otras condiciones de marcaje.

### Experimento 3

Las interacciones con eritrocitos y las variantes de Cyt1Aa biotiniladas se probaron en dos amortiguadores de unión: en solución Alsever pH 7 (amortiguador para prevenir la coagulación de los eritrocitos) y con el amortiguador de fosfatos (PBS en donde se solubilizan las toxinas). En la solución Alsever los eritrocitos



permanecían en condiciones óptimas de no lisis, pero las toxinas precipitaban. En el amortiguador de fosfatos, las toxinas permanecían estables pero los eritrocitos se lisaban. Estos experimentos no permitieron establecer las condiciones de unión óptimas para realizar los ensayos de unión a eritrocitos de conejo.

#### **Experimento 4**

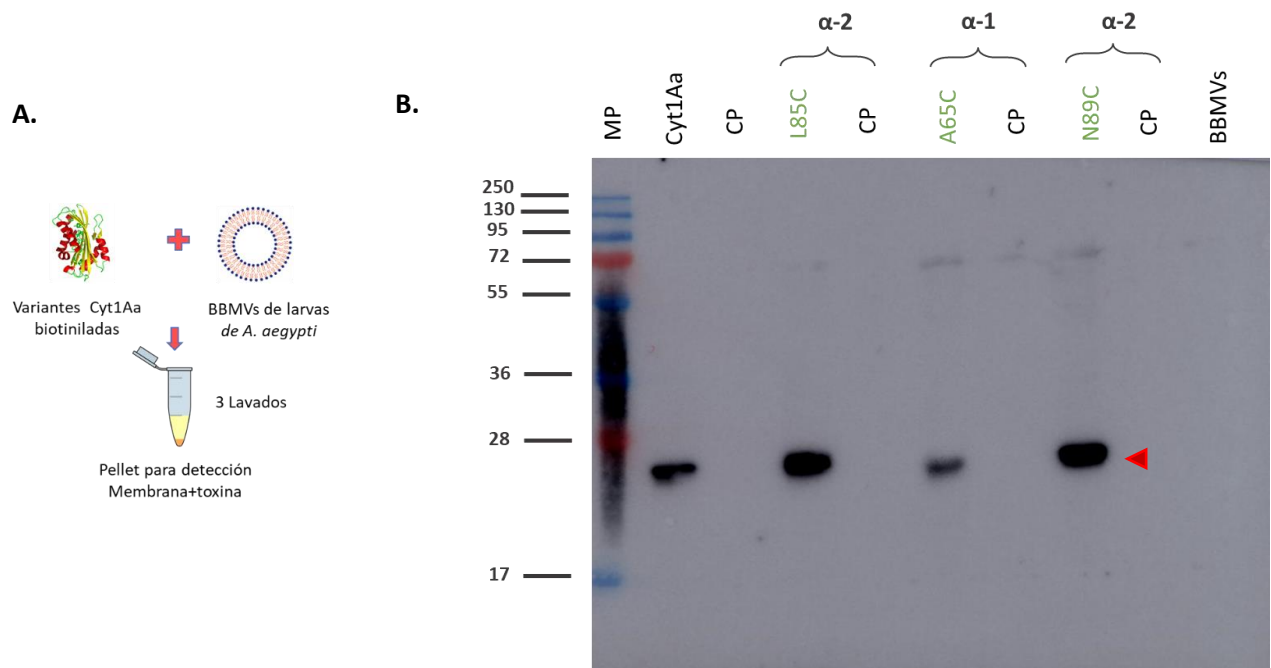
Las interacciones con eritrocitos y las variantes de Cyt1Aa biotiniladas se probaron en dos temperaturas de unión: una temperatura ambiente (20-23°C) y a 37°C para descartar que el fenómeno se viera favorecido por una condición sin embargo no se observó diferencia entre ellas.

Pese a que se probaron diferentes condiciones de la reacción de unión de las variantes de Cyt1Aa a eritrocitos, no logró obtenerse un resultado concluyente ya que las toxinas marcadas con biotina presentaban precipitación en la reacción de unión (datos no mostrados). Estos problemas de precipitación son relevantes al momento de interpretar los resultados, ya que las uniones dependen de la estabilidad de las toxinas con biotina.

#### **III. Ensayo de unión a BBMV del intestino de larvas de *A. aegypti*.**

Para analizar la interacción de las variantes de Cyt1Aa con BBMV del intestino de larvas de *A. aegypti*, propusimos realizar un ensayo de unión cualitativa de estas variantes, con la finalidad de reconocer si la afectación en toxicidad de las variantes de Cyt1Aa no tóxicas a larvas de *A. aegypti* se debe a una pérdida en la capacidad de interacción con las membranas del intestino medio (BBMV) de *A. aegypti*.

Las variantes de Cyt1Aa, N89C y L85C en la hélice  $\alpha$ -2 y A65C en la hélice  $\alpha$ -1, perdieron su toxicidad contra larvas del mosquito *A. aegypti*, por lo que el primer paso fue evaluar si estas variantes eran capaces de interactuar con los intestinos obtenidos de larvas del 3° y 4° estadio (empleados en conjunto) de *A. aegypti*. Para analizar esto, se propuso realizar un ensayo de unión cualitativa de las variantes de Cyt1Aa no tóxicas a larvas de *A. aegypti* A65C, L85C y N89C con BBMV obtenidas del intestino de larvas de *A. aegypti*.



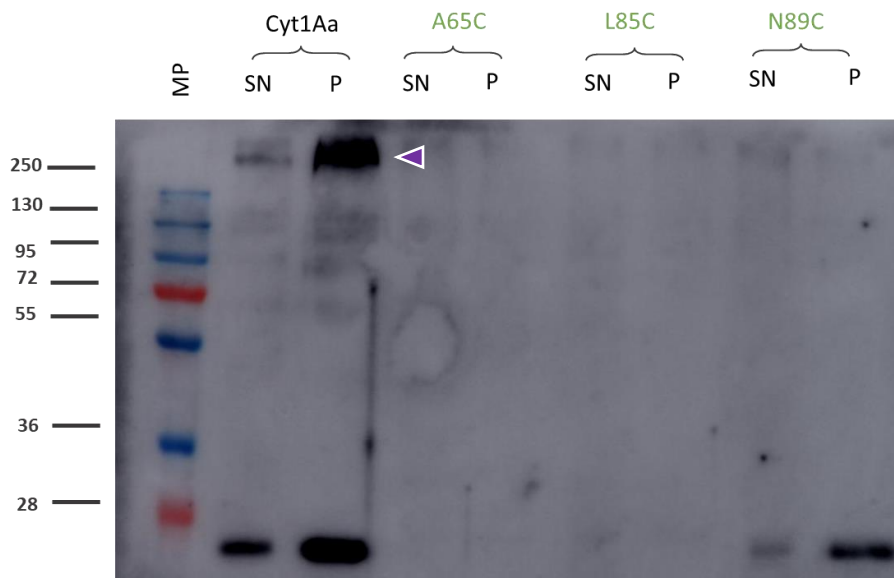
**Figura 20. Ensayo de unión cualitativa con BBMV de *A. aegypti*.** A. Resumen de la metodología empleada para este tipo de ensayo B. Interacción de las variantes de Cyt1Aa no insecticidas L85C, A65C y N89C con BBMV de larvas de *A. aegypti*. resaltadas en verde. CP: control de precipitación. Uniones positivas de las toxinas a BBMV del intestino de larvas de *A. aegypti* (◄). Condiciones empleadas: 10µg/µl de BBMV y 10 nM de las toxinas activadas biotiniladas. Detección con estreptavidina.

Con este ensayo podemos proponer que las variantes de Cyt1Aa no tóxicas contra larvas de *A. aegypti*, L85C, A65C y N89C, son capaces de interactuar con las BBMV aisladas de larvas de *A. aegypti* proponiendo que la interacción con el intestino no es el paso limitante en el efecto tóxico de estas variantes, y que éstas pueden presentar una afectación en los pasos siguientes en el mecanismo de acción de este tipo de toxinas. (ver figura 20).

#### IV. Oligomerización en BBMV de larvas de *A. aegypti*

Para identificar si las variantes de Cyt1Aa no tóxicas contra larvas de *A. aegypti* son capaces de formar estructuras oligoméricas, se realizaron ensayos de oligomerización en presencia de BBMV obtenidas del intestino de larvas de *A. aegypti*.

Las variantes de Cyt1Aa, N89C y L85C en la hélice  $\alpha$ -2 y A65C en la hélice  $\alpha$ -1, muestran una pérdida de su toxicidad contra larvas de *A. aegypti*, sin embargo, estas variantes aún son capaces de interactuar con BBMV obtenidas de larvas de *A. aegypti* como lo muestran los ensayos de unión a BBMV de larvas de *A. aegypti* (ver figura 20). Debido a lo anterior, el siguiente paso a evaluar fue si estas variantes eran aún capaces de formar estructuras oligoméricas, necesarias para el efecto tóxico de estas toxinas, evaluándolo a través de ensayos de oligomerización en presencia de BBMV de larvas de *A. aegypti*.



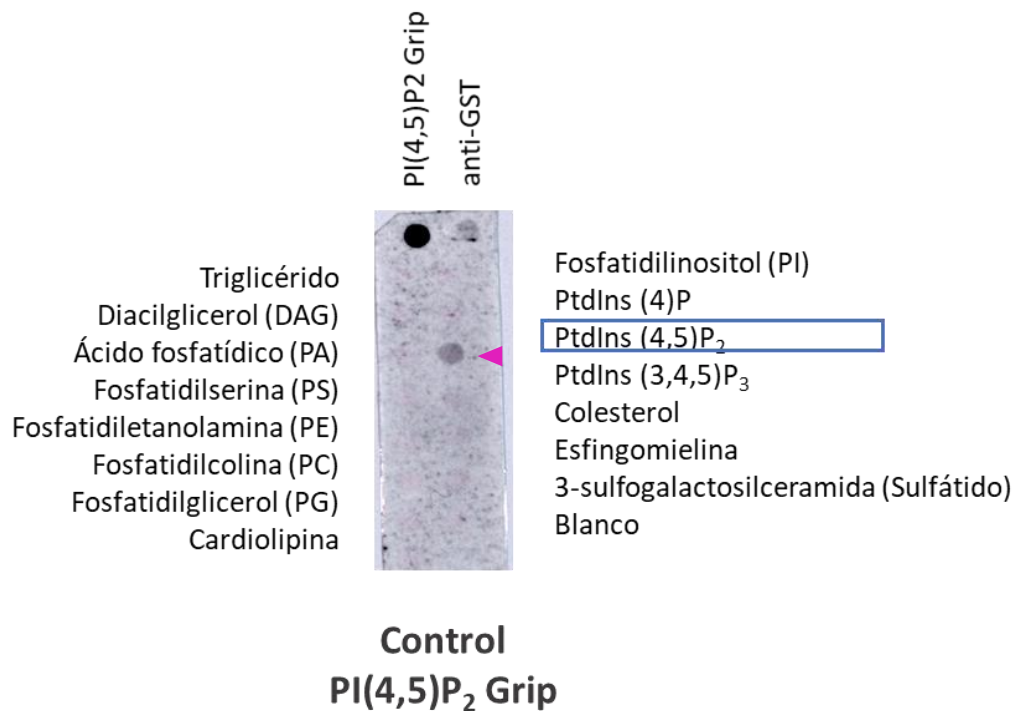
**Figura 21. Ensayo de oligomerización en BBMV de larvas de *A. aegypti*.** Se realizaron los ensayos de oligomerización de las variantes no tóxicas a larvas de *A. aegypti* L85C, A65C y N89C con BBMV de larvas de *A. aegypti*. **SN:** fracción de sobrenadante de la reacción (toxina activada no unida a BBMV). **P:** fracción del pellet de la reacción (toxina activada unida a BBMV formando oligómeros). Condiciones empleadas: 10 $\mu$ g de BBMV, 10ng de tripsina y 200 ng de protoxinas. Las variantes no tóxicas se muestran en verde. Formación de oligómeros de la toxina Cyt1Aa en presencia de BBMV de larvas de *A. aegypti* (◄).

En este ensayo se puede observar la formación de un oligómero de la toxina Cyt1Aa silvestre, con un peso mayor a 250 kDa, en presencia de BBMV's obtenidas de larvas de *A. aegypti* (ver figura 21).

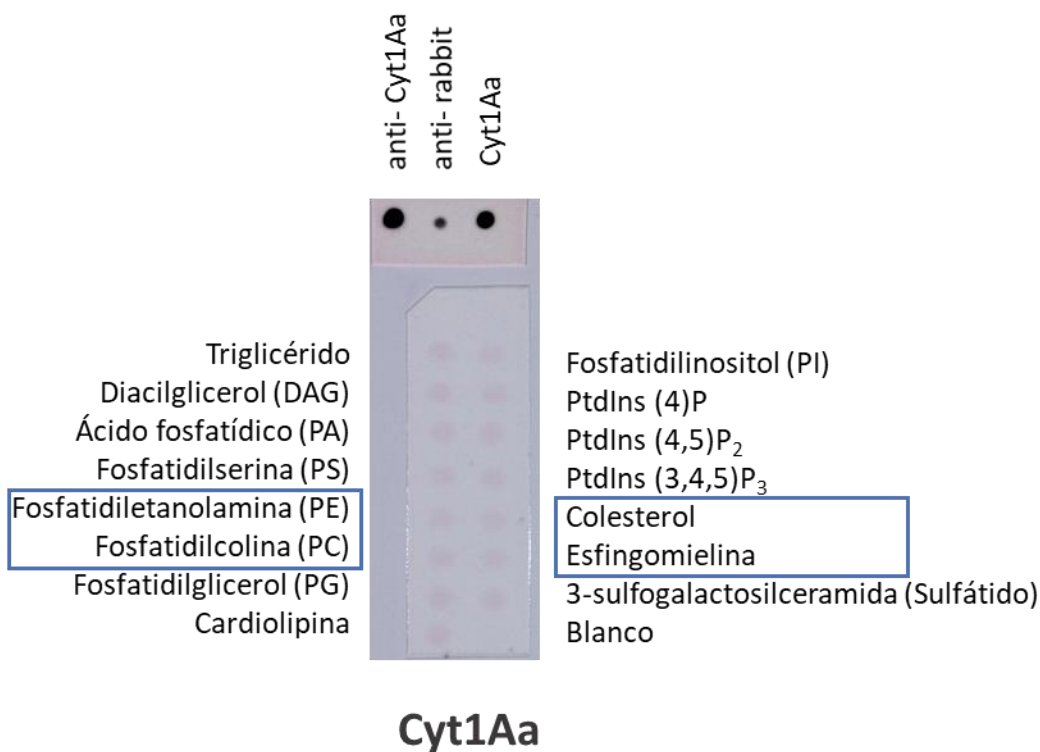
Por el contrario, las variantes de Cyt1Aa no tóxicas a larvas de *A. aegypti*, L85C, A65C y N89C, son incapaces de formar oligómeros en presencia de BBMV's de larvas de *A. aegypti* lo que explica su pérdida de toxicidad hacia larvas del mosquito *A. aegypti* (ver figura 21).

## V. Lipid dot blot

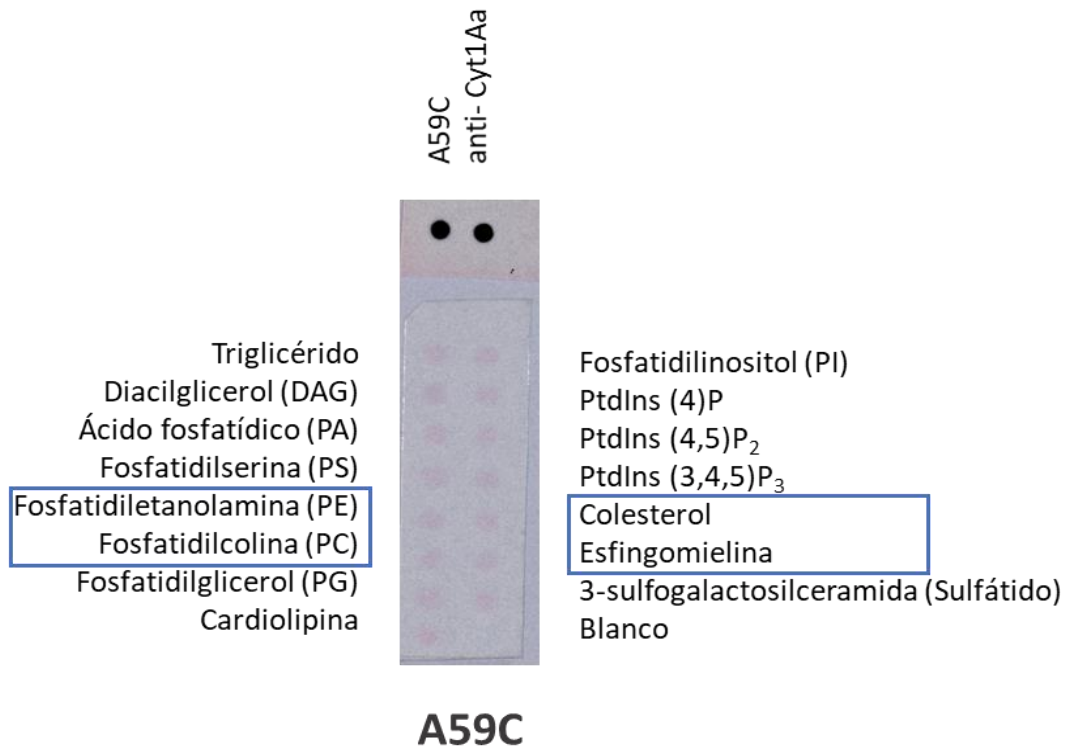
Para identificar si existe un reconocimiento particular por lípidos, se propuso evaluar la interacción de las variantes de Cyt1Aa afectadas en especificidad, las variantes A59C y A88C no hemolíticas y las variantes A65C, L85C y N89C no tóxicas a larvas de *A. aegypti*, en un ensayo de unión a lípidos comerciales Membrana Lipid Strips Echelon que contenían 200 pmol de diferentes lípidos de membrana como triglicérido, diacilglicerol (DAG), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina, fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositol 4 fosfato (PtdIns(4)P), fosfatidilinositol 4,5 fosfato (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>), fosfatidilinositol 3,4,5 fosfato (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>), colesterol, esfingomielina y 3-sulfogalactosilceramida (sulfátido) acoplados en spots independientes en una membrana hidrofóbica.



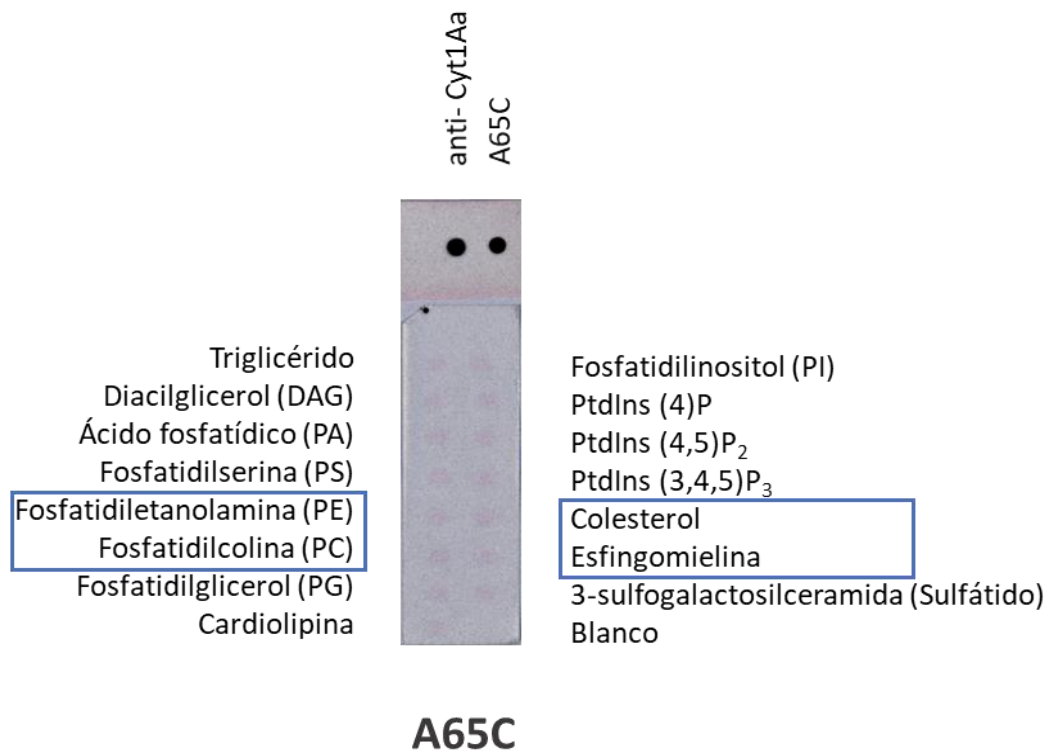
**Figura 22. Interacción con lípidos de membrana comerciales de PI(4,5)P<sub>2</sub> Grip.** En recuadro se resalta el fosfoinositósido PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, el receptor del dominio proteico de PLC-δ1 PH recombinante acoplado a GST empleado como control positivo. Concentración de proteína control empleada 0.5 µg/ml. La interacción positiva del dominio proteico de PLC-δ1 PH recombinante a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> se señala en la figura (◀).



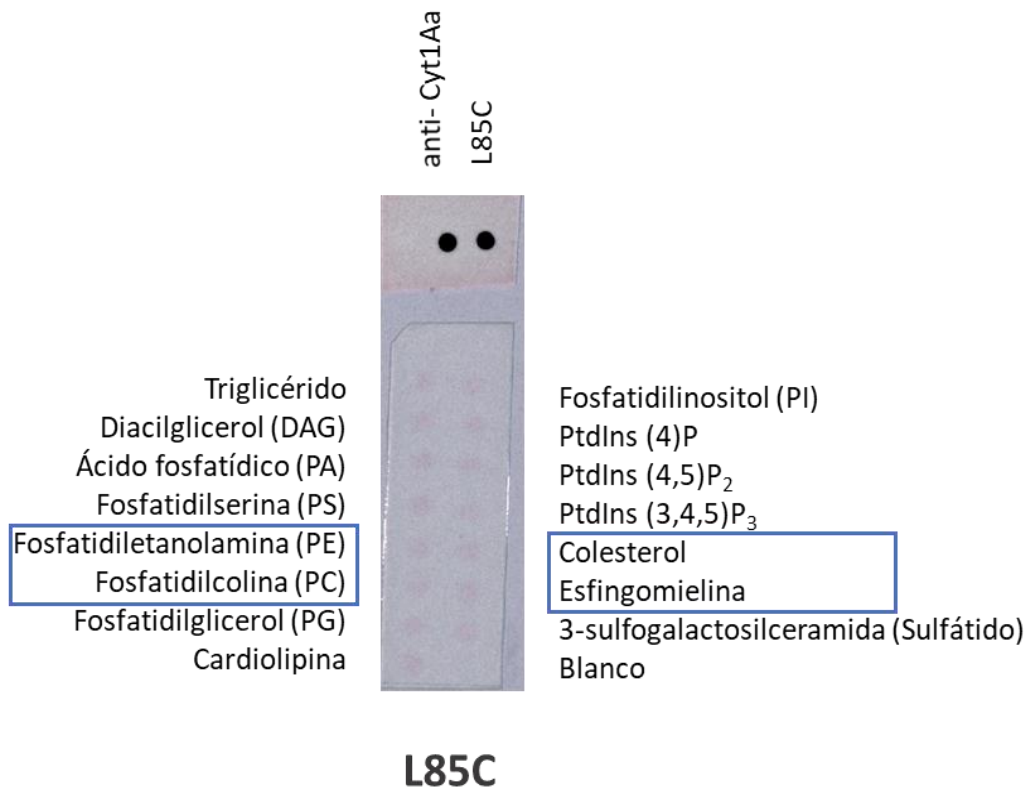
**Figura 23. Interacción con lípidos de membrana comerciales de la toxina Cyt1Aa activada.** En recuadro se resaltan los lípidos importantes para la interacción de la toxina Cyt1Aa a la membrana. Concentración de toxina empleada 1.2 µg/ml.



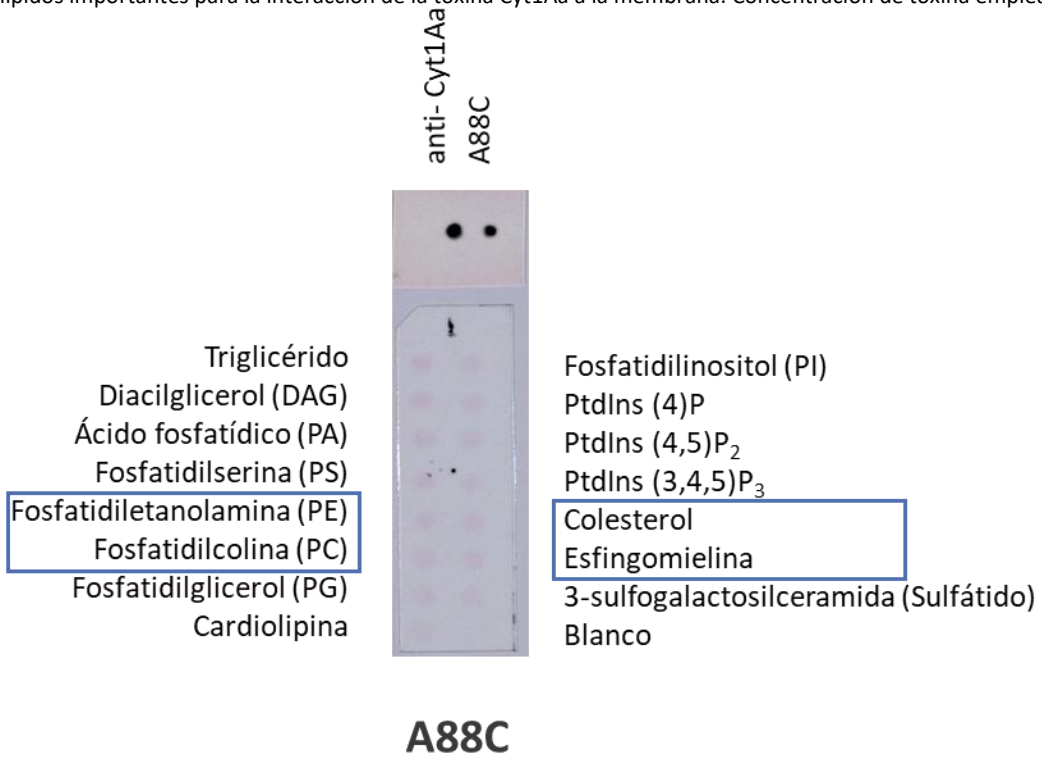
**Figura 24. Interacción con lípidos de membrana comerciales de la variante de Cyt1Aa A59C activada.** En recuadro se resaltan los lípidos importantes para la interacción de la toxina Cyt1Aa a la membrana. Concentración de toxina empleada 1.2 µg/ml.



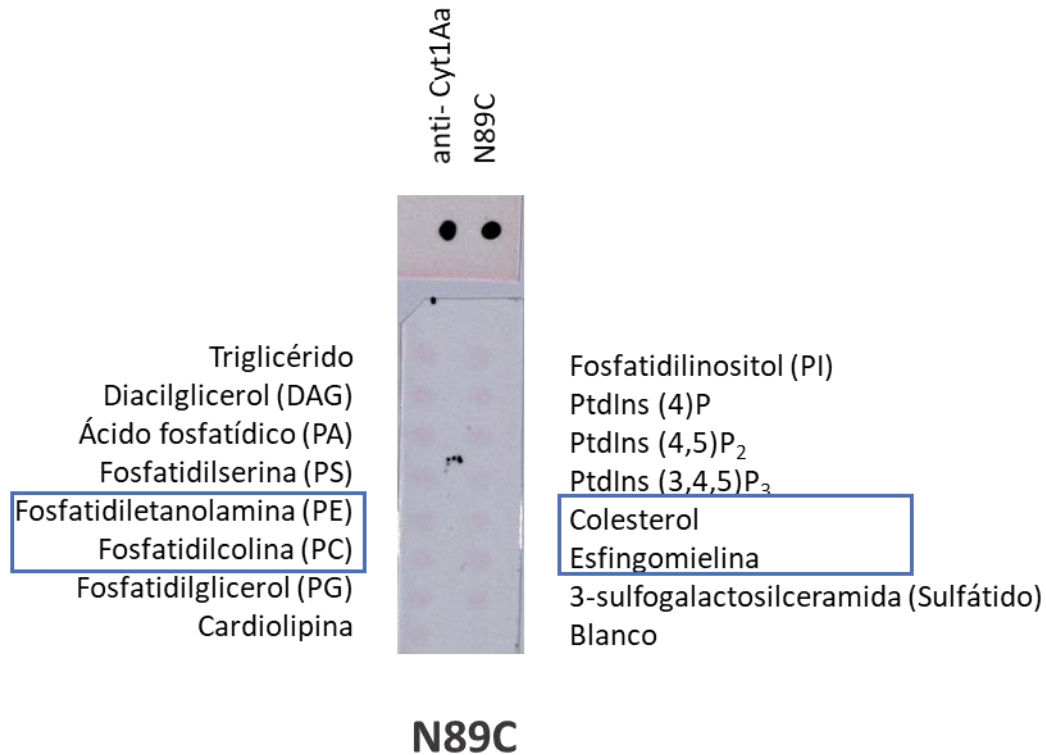
**Figura 25. Interacción con lípidos de membrana comerciales de la variante de Cyt1Aa A65C activada.** En recuadro se resaltan los lípidos importantes para la interacción de la toxina Cyt1Aa a la membrana. Concentración de toxina empleada 1.2 µg/ml.



**Figura 26. Interacción con lípidos de membrana comerciales de la variante de Cyt1Aa L85C activada.** En recuadro se resaltan los lípidos importantes para la interacción de la toxina Cyt1Aa a la membrana. Concentración de toxina empleada 1.2 µg/ml.



**Figura 27. Interacción con lípidos de membrana comerciales de la variante de Cyt1Aa A88C activada.** En recuadro se resaltan los lípidos importantes para la interacción de la toxina Cyt1Aa a la membrana. Concentración de toxina empleada 1.2 µg/ml.



**Figura 28. Interacción con lípidos de membrana comerciales de la variante de Cyt1Aa N89C activada.** En recuadro se resaltan los lípidos importantes para la interacción de la toxina Cyt1Aa a la membrana. Concentración de toxina empleada 1.2 µg/ml.

Como se observa en estos análisis de unión a lípidos de membrana acoplados, ninguna de las variantes de Cyt1Aa activadas obtenidas en este trabajo y previamente, A59C, A65C, L85C, A88C y N89C, son capaces de interactuar con los lípidos de manera individual. Incluso estas variantes de Cyt1Aa son incapaces de interactuar con los lípidos propuestos previamente por Thomas y Ellar como la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, la esfingomielina y el colesterol (ver figura 24-28).

El mismo comportamiento se observó para la toxina Cyt1Aa silvestre activada que se empleó como punto de referencia en este ensayo (ver figura 23).

Para descartar algún daño de los lípidos de membrana acoplados durante la metodología, se empleó el control positivo incluido en estas membranas con lípidos comerciales, el receptor del dominio proteico de PLC- $\delta 1$  PH recombinante acoplado a GST, el cual interactuó correctamente con el fosfoinositósido PI(4,5)P<sub>2</sub> como se describe en la literatura (ver figura 22).



## DISCUSIÓN

*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) es una bacteria que se ha utilizado en el biocontrol de mosquitos, los cuales son transmisores de enfermedades, ya que sintetiza toxinas insecticidas que matan al estadio larvarios de varios órdenes de insectos. Entre las toxinas que sintetiza *Bti* se encuentran las toxinas de 3 dominios Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa y Cry11Aa y las toxinas citotóxicas, Cyt1Aa y Cyt2Ba.

Una de las toxinas más interesantes es la toxina Cyt1Aa, la cual es citotóxica contra diferentes tipos celulares desde eritrocitos hasta fibroblastos (Knowles et al., 1992; Cahan et al., 2008) A diferencia de las toxinas Cry de 3 dominios, las toxinas Cyt han sido poco estudiadas. La especificidad de este tipo de toxinas es un tema que se ha abordado poco en la literatura, proponiendo que éstas interactúan directamente con lípidos de la membrana (Thomas & Ellar, 1983b).

Resultados previos en el laboratorio habían determinado que mutaciones puntuales en la hélice  $\alpha$ -1 de la toxina Cyt1Aa presentaban una disminución de su actividad hemolítica en eritrocitos de conejo, pero seguían presentando toxicidad en larvas del mosquito *A. aegypti* (Bravo et al., 2018). Esto propuso que la hélice  $\alpha$ -1 y la hélice  $\alpha$ -2 en la misma horquilla de la toxina Cyt1Aa podrían estar involucradas en la interacción y el reconocimiento de tipo celular, por lo que mutaciones en esta región permitirían identificar su papel en la especificidad de este tipo de toxinas.

En el presente trabajo realizamos mutaciones puntuales individuales de *cyt1Aa* que abarcan tanto la hélice  $\alpha$ -1 como  $\alpha$ -2, que hemos propuesto como la región involucrada en la interacción y especificidad de esta toxina, con el fin de obtener variantes de Cyt1Aa para analizar su comportamiento tóxico a larvas de *A. aegypti*, hemolítico, de unión a BBMV, de oligomerización a BBMV y de unión a lípidos de membrana acoplados.

Para este trabajo se diseñaron oligonucleótidos mutagénicos para sustituir los aminoácidos I52C, Q54C, A55C, I56C y A65C en la hélice  $\alpha$ -1 y los aminoácidos K83C, G84C, L85C, E86C y A88C en la hélice  $\alpha$ -2 de la toxina Cyt1Aa al codón preferencial de cisteína (ver figura 12).

En este trabajo se obtuvieron 10 mutantes en *cyt1Aa* de *B. thuringiensis*: las mutantes *cyt1Aa:I52C*, *cyt1Aa:Q54C*, *cyt1Aa:A55C*, *cyt1Aa:I56C*, *cyt1Aa:A65C* en la hélice  $\alpha$ -1, y las mutantes *cyt1Aa:K83C*, *cyt1Aa:G84C*, *cyt1Aa:L85C*, *cyt1Aa:E86C* y *cyt1Aa:A88C* en la hélice  $\alpha$ -2, las cuales se comprobaron por secuenciación (ver figura 13). La mutante *cyt1Aa:L53C* no pudo ser obtenida a pesar de varios intentos de mutagénesis dirigida.

Una vez en obtenidas las mutantes en *B. thuringiensis* se purificaron los cristales proteicos de estas variantes para proseguir con la caracterización de estas toxinas, evaluando como primer punto su expresión. Las variantes de CytAa A55C, A65C, K83C, L85C, E86C y A88C mostraron una correcta expresión y purificación en *B. thuringiensis* (ver figura 14A), mientras que las variantes G84C, I56C, Q54C y I52C no se expresaron correctamente por lo que decidimos no continuar con su caracterización (ver figura 14B). Cabe resaltar que las variantes I56C, L53C, Q54C y I52C que fueron incapaces de expresarse se encuentran en la hélice  $\alpha$ -1 de Cyt1Aa, lo que propone que la modificación de los residuos en esta región de la toxina afecta de alguna manera su estructura, lo que impide su correcta expresión en *B. thuringiensis* aunque esta afectación no fue evaluada en este trabajo.

Además de las variantes de Cyt1Aa obtenidas en este trabajo se decidió continuar con la caracterización en conjunto de dos variantes más de Cyt1Aa obtenidas en trabajos previos desarrollados en el laboratorio, la variante A59C en la hélice  $\alpha$ -1 y la variante N89C en la hélice  $\alpha$ -2 de la toxina Cyt1Aa (ver figura 14C).

Posteriormente a la purificación de los cristales proteicos de todas las variantes de Cyt1Aa, se realizaron ensayos de solubilización y activación con tripsina, emulando el procesamiento de estas toxinas en el intestino de las larvas de los insectos blanco. Todas las variantes de Cyt1Aa mostraron una correcta solubilización en el amortiguador de carbonatos y activación con tripsina, observando el procesamiento de las variantes de Cyt1Aa de protoxinas con un peso aproximado de 27 kDa a toxinas activas con un peso aproximado de 24 kDa tras la activación con tripsina (ver figura 15). Para el caso de la variante de Cyt1Aa L85C se ajustaron algunas condiciones en el proceso de solubilización, sustituyendo el amortiguador de carbonatos por NaOH 50mM, debido a que esta variante presenta algún tipo de afectación en su estabilidad al solubilizarse con el amortiguador de carbonatos (datos no mostrados).

De manera secundaria se realizó un análisis de western blot anti Cyt1Aa, comprobando que todas las variantes de Cyt1Aa activadas eran modificaciones de la toxina Cyt1Aa silvestre de *Bti* (ver figura 16).

Para analizar el efecto tóxico de las variantes de Cyt1Aa en larvas del mosquito *A. aegypti*, se realizaron bioensayos para evaluar la mortalidad de larvas del 4° estadio del mosquito *A. aegypti* en respuesta a diferentes concentraciones de las variantes de Cyt1Aa (concentraciones empleadas mostradas en tabla 7).

Como se observa en los resultados de los bioensayos con larvas de *A. aegypti*, las variantes N89C y L85C en la hélice  $\alpha$ -2 de Cyt1Aa y la variante A65C en la hélice  $\alpha$ -1 de Cyt1Aa presentan una pérdida en su capacidad tóxica con respecto a la toxina Cyt1Aa silvestre con valores de concentración de las toxinas superiores a 2500 ng/ml, lo que demuestra que la modificación de estos aminoácidos en las hélices  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 afecta

negativamente la actividad tóxica de la toxina Cyt1Aa a larvas del mosquito *A. aegypti* (ver tabla 5). Previamente se habían caracterizados las variantes A59C y A61C en la hélice  $\alpha$ -1 de la toxina Cyt1Aa donde se reportó que estas variantes perdieron su actividad hemolítica contra eritrocitos de conejo, pero conservando su actividad tóxica a larvas de *A. aegypti* (Bravo et al., 2018). Por lo anterior podemos sugerir que las mutaciones en la hélice  $\alpha$ -1 no solo afectan la actividad hemolítica de la toxina Cyt1Aa como se había propuesto previamente, sino que también afecta la toxicidad ya que al modificar el residuo A65 en la hélice  $\alpha$ -1 de Cyt1Aa se puede observar una afectación negativa en la toxicidad de la toxina Cyt1Aa a larvas de *A. aegypti*.

Con los datos obtenidos en los bioensayos en larvas de *A. aegypti*, se calcularon los valores de dosis letal media (LC<sub>50</sub>) y se determinó que la variante A88C de Cyt1Aa es significativamente más tóxica a larvas de *A. aegypti* que la toxina Cyt1Aa silvestre (ANOVA,  $p=0.05$ ), mientras que el resto de las variantes mostró un comportamiento tóxico similar al de la toxina Cyt1Aa silvestre (ver tabla 5).

Para evaluar si la modificación de los aminoácidos A88C, E86C, L85C y K83C en la hélice  $\alpha$ -2 y A55C en la hélice  $\alpha$ -1 de la toxina Cyt1Aa afectaba la especificidad a otros tipos celulares, se analizó el efecto tóxico en larvas de un organismo no blanco de la toxina Cyt1Aa, el lepidóptero *M. sexta*, una polilla plaga de las plantas de la familia Solanaceae. Los resultados de estos bioensayos mostraron que las variantes de Cyt1Aa A88C, E86C, L85C, K83C y A55C no son tóxicas contra el lepidóptero *M. sexta*, proponiendo que la modificación de estos aminoácidos tanto en la hélice  $\alpha$  - 1 como  $\alpha$  - 2, no cambia la toxicidad de la toxina Cyt1Aa hacia lepidópteros como se había observado para las variantes A59C y A61C en la hélice  $\alpha$ -1 de Cyt1Aa que habían mostrado un efecto tóxico contra, *Diabrotica virgifera virgifera*, un coleóptero plaga del maíz (ver figura 17) (Bravo et al., 2018).

Seguido a estos se analizó el efecto tóxico en eritrocitos de conejo ya que se sabe que esta toxina presenta un efecto citotóxico hacia diferentes tipos celulares entre ellos eritrocitos de conejo en experimentos *in vitro* (Knowles et. al, 1992). El efecto tóxico a eritrocitos de conejo se evaluó a través de ensayos de hemólisis para determinar el comportamiento hemolítico de estas variantes de Cyt1Aa, así como calcular los valores de dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>). Los resultados del ensayo de hemólisis demostraron que las variantes de Cyt1Aa A59C y A88C muestran una afectación negativa en su actividad hemolítica en eritrocitos de conejo, confirmando que la variante A59C no tiene actividad hemolítica en eritrocitos de conejo mientras que la variante A88C presenta una afectación negativa considerable en su actividad hemolítica ya que se requiere una mayor concentración de ésta para observar un fenómeno hemolítico en los eritrocitos de conejo (ver figura 18). Los resultados del análisis estadístico realizado a los datos obtenidos en el ensayo de la actividad

hemolítica de las variantes de Cyt1Aa demostraron que la variante A59C fue significativamente menos hemolítica que el resto de las variantes de Cyt1Aa. Por el contrario, la variante N89C mostró ser significativamente más hemolítica que las variantes L85C y A88C (ANOVA,  $p=0.05$ ), demostrando que la modificación de estos aminoácidos en las hélices  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 afecta la capacidad hemolítica de la toxina Cyt1Aa (ver figura 18 y ver tabla 6).

En resumen, las variantes de Cyt1Aa A59C en la hélice  $\alpha$ -1 y A88C en la hélice  $\alpha$ -2 de Cyt1Aa mostraron una afectación negativa en su actividad hemolítica contra eritrocitos de conejo, aunque ambas variantes siguen siendo tóxicas contra larvas de *A. aegypti*. Por el contrario, las variantes de Cyt1Aa A65C en la hélice  $\alpha$ -1 de Cyt1Aa y las variantes N89C L85C en la hélice  $\alpha$ -2 de Cyt1Aa perdieron su toxicidad contra larvas de *A. aegypti*, pese a que estas variantes seguían teniendo su actividad tóxica contra eritrocitos de conejo (toxicidad a larvas de *A. aegypti*: ver tabla 5 y actividad hemolítica: figura 18/tabla 6). Esto permitió reconocer que ambas actividades tóxicas pueden separarse por mutaciones puntuales en las hélices  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 de la toxina Cyt1Aa, confirmando que estas regiones están involucradas en la especificidad de la toxina Cyt1Aa.

Con la finalidad de reconocer si la afectación de ambas toxicidades, tanto a larvas de *A. aegypti* como a eritrocitos de conejo, en las variantes de Cyt1Aa analizadas en este trabajo se debe a una afectación en el paso de interacción con la membrana blanco, se realizaron ensayos de unión con eritrocitos de conejo y con vesículas de las microvellosidades de la membrana del intestino medio (BBMVs) obtenidas de larvas del 3° y 4° estadio de *A. aegypti*, así como ensayos de unión a lípidos de membrana acoplados a una membrana hidrofóbica para evaluar cambios en el reconocimientos de los lípidos receptores de este tipo de toxinas.

Como primer paso a esto se marcaron con biotina las variantes de Cyt1Aa, las cuales mostraron una correcta derivatización con biotina (ver figura 19). Una vez marcadas, estas variantes se usaron para realizar los ensayos posteriores de unión a eritrocitos y a BBMVs de larvas de *A. aegypti*.

Tras varios intentos para realizar los ensayos de unión a eritrocitos no se pudo concluir si existe o no unión de las variantes de Cyt1Aa no hemolíticas, A59C y A88C, ya que no se encontraron las condiciones óptimas en donde ambos componentes, los eritrocitos y las variantes de Cyt1Aa obtenidas en este trabajo, preservarían su estabilidad, siendo éste un parámetro muy importante al momento de interpretar los resultados de unión (resultados no mostrados). Debido a estos problemas experimentales optamos por pausar esta parte del proyecto.

Posteriormente se realizaron los ensayos de unión de las variantes de Cyt1Aa N89C, L85C y A65C no tóxicas a larvas de *A. aegypti* con BBMV's aisladas de larvas de *A. aegypti*. En este experimento se puede observar que las variantes de Cyt1Aa no tóxicas a larvas de *A. aegypti* son capaces de interactuar con las BBMV's de larvas de *A. aegypti*, proponiendo que la interacción no es el paso limitante en la pérdida de su capacidad tóxica en larvas de *A. aegypti*, abriendo la posibilidad de que estas mutaciones afectan pasos posteriores a la interacción con la membrana como el paso de oligomerización o la misma formación de poro en la membrana del intestino de las larvas (ver figura 20). Debido a que se trata de un ensayo de unión cualitativa es difícil establecer valores para evaluar cuáles variantes se unen más o menos a las BBMV's de larvas de *A. aegypti*, ya que para ello se tendrían que realizar otras aproximaciones experimentales como ensayos de ELISA, un método cuantitativo que se emplea para reconocer propiedades de unión proteína-lípido (membrana), entre otros.

Dado que las variantes de Cyt1Aa A65C, L85C y N89C no tóxicas a larvas de *A. aegypti* fueron capaces de interactuar con las BBMV's obtenidas de larvas de *A. aegypti* (ver figura 20), se realizó otra aproximación con ensayos de oligomerización de estas toxinas en presencia de BBMV's de larvas de *A. aegypti* para evaluar si éste es el paso limitante en estas variantes. En el ensayo de oligomerización se observó que la toxina silvestre Cyt1Aa es capaz de formar un oligómero con un tamaño mayor a 250 kDa, compuesto por 10 monómeros de la toxina Cyt1Aa aproximadamente, mientras que las variantes no tóxicas a larvas de *A. aegypti*, A65C, L85C y N89C, fueron incapaces de formar estructuras oligoméricas en presencia de las BBMV's de larvas de *A. aegypti*, lo que explica su pérdida de toxicidad hacia larvas de *A. aegypti* (ver figura 21).

Además de los ensayos de unión a BBMV's de larvas de *A. aegypti*, se realizaron ensayos de unión a lípidos de membrana acoplados a una membrana obtenidos comercialmente con la finalidad de reconocer si las variantes de Cyt1Aa no tóxicas a larvas de *A. aegypti* y las variantes de Cyt1Aa no hemolíticas, presentaban un reconocimiento diferencial de lípidos de membrana comerciales, que se encuentran acoplados a una membrana hidrofóbica. En estos ensayos se demostró que la toxina Cyt1Aa activada no interactúa con ninguno de los lípidos de membrana acoplados de manera individual, incluso es incapaz de interactuar con aquellos lípidos propuestos como receptores lipídicos de esta toxina por Thomas y Ellar como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, esfingomiélin y colesterol (ver figura 23) (Thomas & Ellar, 1983b). Como control positivo se observó que el dominio proteico de PLC- $\delta$ 1 PH recombinante acoplado a GST es capaz de reconocer al fosfoinosítido PI(4,5)P<sub>2</sub>, descartando alguna afectación de los lípidos acoplados a la membrana durante la manipulación de ésta (ver figura 22).

Así mismo, las variantes de Cyt1Aa A65C, L85C y N89C no tóxicas a larvas de *A. aegypti* y las variantes de Cyt1Aa A59C y N89 no hemolíticas, al igual de la toxina Cyt1Aa silvestre, son incapaces de interactuar con lípidos de membrana acoplados de manera individual a una membrana hidrofóbica, incluso con aquellos propuestos como receptores de éstas como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, esfingomiélinea y colesterol (ver figuras 24-28). Este comportamiento se observó incluso al aumentar la concentración de las toxinas a 5 µg/ml, lo que corresponde a 5 veces lo indicado en el protocolo comercial (resultados no mostrados).

A partir de los ensayos de unión a lípidos de membrana podemos concluir que la toxina Cyt1Aa, las variantes de Cyt1Aa A65C, L85C y N89C no tóxicas a larvas de *A. aegypti* y las variantes de Cyt1Aa A59C y A88C, no hemolíticas obtenidas en este trabajo, no interactúan directamente con lípidos de membrana acoplados individualmente, incluso son incapaces de interactuar con los lípidos propuestos por Thomas y Ellar como receptores lipídicos de este tipo de toxinas. Esto parece indicar que la interacción de toxina Cyt1Aa con la membrana no es a través de lípidos individuales, sino que dependen de otras características de la configuración lipídica en la membrana blanca. Si bien este ensayo evaluó la interacción a lípidos de membrana individuales, cabe resaltar que los ensayos realizados por Thomas y Ellar analizaron la interacción de la toxina Cyt1Aa a estructuras lipídicas más complejas como lo son los liposomas compuestos por fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, esfingomiélinea y colesterol, lo que no permite una comparación directa entre ambos experimentos (Thomas & Ellar, 1983b).

De manera interesante, estas variantes de Cyt1Aa tampoco reconocieron el colesterol, un lípido que se propone promueve la interacción de la toxina Cyt2Aa2, una toxina producida también por *B. thuringiensis* con una similitud del 91% con Cyt1Aa. Tharad y colegas evaluaron la dinámica de unión de esta toxina a bicapas lipídicas con diferentes concentraciones de colesterol observando que la mayor concentración de colesterol empleada con una relación de 5:2 fosfatidilcolina y colesterol (POPC: Chol) aumenta la tasa de unión específica de la toxina Cyt2Aa2 a la membrana lipídica, y a su vez, induce a cambios en las propiedades de superficie de estas membranas. Si bien proponen que el colesterol es importante para la unión de esta toxina a la membrana, también aclaran que este lípido no es requerido para la unión a la membrana por lo que este lípido no actúa como un receptor de este tipo de toxinas (Sudarat Tharad, Promdonkoy, & Toca-herrera, 2019).

Los resultados de la unión a lípidos confirman que la interacción de la toxina Cyt1Aa depende no solo del tipo de lípido sino de varias características de los lípidos de la membrana como lo sustentan Tharad y colegas quienes investigaron la interacción de la toxina Cyt2Aa2 a bicapas lipídicas con lípidos de diferentes cadenas

de acilo (fase lipídica). Para ello sintetizaron bicapas lipídicas compuestas por fosfatidilcolina (POPC-saturado) y dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC - insaturado), los cuales tienen la misma cabeza polar pero diferentes cadenas de acilo, evaluando la dinámica de unión de la Cyt2Aa2 a estas membranas a través de microscopía de fuerza atómica y microbalance de cristales de cuarzo. Ellos determinaron que la fase lipídica influye en la interacción de esta toxina a la membrana ya que esta toxina se une selectivamente a las bicapas compuestas por POPC (1:4 DPPC/POPC), concluyendo que la unión de estas toxinas depende de la fase lipídica (cadena de acilos de los lípidos) y del arreglo y orientación de las moléculas lipídicas en la membrana (Sudarat Tharad et al., 2019).

Con estos datos podemos proponer que los lípidos individuales fijados en las membranas empleados para los ensayos de unión no presentan la configuración correcta como lo estarían en una conformación de una membrana lipídica o en su caso en una conformación de liposoma, por lo que las toxinas fueron incapaces de reconocerlos (ver figuras 23-28).

Con todos los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos proponer que si bien las hélices  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 son importantes en la actividad tóxica a larvas de *A. aegypti* y la actividad hemolítica, ya que podemos separar ambas toxicidades por mutaciones puntuales en la hélice  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 como se muestra en el presente trabajo. Aunque si bien este trabajo demuestra que las hélices  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 son importantes para la toxicidad de Cyt1Aa, éstas no son las únicas regiones involucradas en el reconocimiento y unión a la membrana blanco ya que mutantes en otras regiones afectan la actividad tóxica a larvas de *A. aegypti* y hemolítica de la toxina Cyt1Aa como lo demuestran otros trabajos realizados recientemente en el laboratorio.

Uno de estos proyectos fue que realizó por la Dra. Mary Torres Quintero quién realizó ingeniería genética para insertar un fragmento del asa 3 de la toxina Cry1Ab, fragmento involucrado en la interacción con sus receptores proteicos, en diferentes asas de la toxina Cyt1Aa. Estas químeras de la toxina Cyt1Aa perdieron su actividad tanto hemolítica como tóxica, ganando toxicidad contra lepidópteros, lo que demuestra que modificaciones en otras regiones de la toxina Cyt1Aa tienen un efecto en la especificidad de esta toxina (Torres-Quintero et al., 2018)

Otro de estos proyectos fue el que desarrolló la Dra. Janette Onofre quién obtuvo mutaciones puntuales en toda la toxina Cyt1Aa con la finalidad de realizar el marcaje de estas variantes y evaluar la dinámica de interacción en eritrocitos, BBMV de larvas de *A. aegypti* y en liposomas. Los resultados de su trabajo demostraron que modificaciones en varias regiones de la toxina tienen un efecto en la actividad tóxica a

larvas de *A. aegypti* de la toxina y principalmente en la actividad hemolítica, ya que 3 de las 9 variantes de Cyt1Aa obtenidas presentaron una afectación negativa en la actividad hemolítica. Junto con esto se demostró que la dinámica de unión a las membranas del intestino y a los eritrocitos es diferentes proponiendo que el mecanismo de acción en ambos tipos celulares puede ser distinto (datos no publicados).

Con todos estos experimentos podemos proponer que el efecto tóxico a larvas y hemolítico de la toxina Cyt1Aa de *B. thuringiensis* se trata probablemente de mecanismos de acción diferentes, ya que ambas toxicidades pueden separarse por mutaciones puntuales, y que probablemente la interacción con la membrana, y por consiguiente, la especificidad de la toxina Cyt1Aa, es un tema mucho más complejo de lo que se conoce y que existe mucho por entender de este tipo de toxinas y de su interacción proteína-lípido con la membrana.



## CONCLUSIONES

Las mutaciones puntuales realizadas en las hélices  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 de Cyt1Aa produjeron variantes no tóxicas a eritrocitos y variantes no tóxicas a larvas de *A. aegypti*, por lo tanto, ambas hélices están involucradas en la especificidad de la toxina Cyt1Aa.

Las mutaciones puntuales realizadas en las hélices  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 de Cyt1Aa no promueven la toxicidad hacia el lepidóptero *M. sexta*.

Las variantes de Cyt1Aa no tóxicas a larvas de *A. aegypti* son capaces de interactuar con BBMV de larvas de *A. aegypti* pero son incapaces de formar estructuras oligoméricas, explicando su pérdida de toxicidad hacia larvas de *A. aegypti*.

La toxina Cyt1Aa y las variantes de Cyt1Aa afectadas en especificidad no interactúan directamente con lípidos de membrana acoplados individualmente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adang, M. J., Zhang, Q., & Hua, G. (2016). Effects and mechanisms of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins for mosquito larvae. *Insect Science*, *1958*, 1–16.
- Agaisse, H., & Lereclus, D. (1995). How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *Journal of Bacteriology*, *177*(21), 6027–6032.
- Al-Yahyaee, S. A. S., & Ellar, D. J. (1996). Cell targeting of a pore-forming toxin, CytA  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis*, by conjugating CytA with anti-Thy 1 monoclonal antibodies and insulin. *Bioconjugate Chemistry*, *7*(4), 451–460.
- Bel, Y., Granero, F., Alberola, T. M., Martínez-Sebastian, M. J., & Ferré, J. (1997). Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in olive tree environments in Spain. *Systematic and Applied Microbiology*, *20*(4), 652–658.
- Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinai, R., Manasherob, R., Margalith, Y. (1997). Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(12), 4883–4890.
- Berbert-Molina, M. A., Prata, A. M. R., Pessanha, L. G., & Silveira, M. M. (2008). Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* growth on high glucose concentrations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *35*(11), 1397–1404. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0439-1>
- Berry, C., Ben-dov, E., Jones, A. F., Murphy, L., Quail, M. A., Holden, M. T. G., Parkhill, J. (2002). Complete Sequence and Organization of pBtoxis, the Toxin-Coding Plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(10), 5082–5095.
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D. J., & Li, J. (2005). Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *Journal of Molecular Biology*, *348*(2), 363–382.
- Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C., & Lescar, J. (2006). Structure of the Functional Form of the Mosquito Larvicidal Cry4Aa Toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Angstrom Resolution. *Journal of Bacteriology* *188*(9), 2039.
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2009). Entomotoxicity, protease and chitinase activity of *Bacillus thuringiensis* fermented wastewater sludge with a high solids content. *Bioresource Technology*, *100*(19), 4317–4325.
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, *49*(4), 423–435.
- Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *41*(7), 423–431.
- Bravo, A., López-Díaz, J. A., Yamamoto, T., Harding, K., Zhao, J.-Z., Mendoza, G., Soberón, M. (2018). Susceptible and mCry3A resistant corn rootworm larvae killed by a non-hemolytic *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa mutant. *Scientific Reports*, *8*(1), 17805.
- Bravo, A., Sánchez, J., Kouskoura, T., & Crickmore, N. (2002). N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. *Journal of Biological*

*Chemistry*, 277(27), 23985–23987.

- Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Quintero, R. (1998). Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 4965–4972.
- Butko, P. (2003). Cytolytic Toxin Cyt1A and Its Mechanism of Membrane Damage : Data and Hypotheses. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2415–2422.
- Caccia, S., Di, I., La, A., Marinelli, A., Varricchio, P., & Franzetti, E. (2016). Midgut microbiota and host immunocompetence underlie *Bacillus thuringiensis* killing mechanism. *PNAS*, 113(34).
- Cahan, R., Friman, H., & Nitzan, Y. (2008). Antibacterial activity of Cyt1 Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp, israelensis. *Microbiology*, 154(11), 3529–3536.
- Cantón, P. E., López-Díaz, J. A., Gill, S. S., Bravo, A., & Soberón, M. (2014). Membrane binding and oligomer membrane insertion are necessary but insufficient for *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa toxicity. *Peptides*, 53, 286–291.
- Cantón, P. E., Zavala, L. E., Pardo-López, L., Bravo, A., Gómez, I., & Soberón, M. (2011). Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin Remain Exposed to the Solvent after Insertion of Part of Domain I into the Membrane . *Journal of Biological Chemistry*, 286(21), 19109–19117.
- Chakroun, M., Bel, Y., & Escriche, B. (2016). Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins ( Vip ) from. *Microbiology and Molecular Biology*, 80(2), 329–350.
- 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. *Journal of Molecular Biology*, 413(4), 804–814.
- 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* subspecies *israelensis*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(39), 28301–28308.
- Crickmore, N., Bone, E. J., Williams, J. A., & Ellar, D. J. (1995). Contribution of the individual components of the  $\delta$ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 131(3), 249–254.
- Dai, S., Gao, M., Yi, D., Li, R., & Wu, Y. (2008). Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from soil in China and their pesticidal activities. *Biological Control*, 44(3), 380–388.
- De Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., & Schnepf, H. E. (2003). Structure, Diversity, and Evolution of Protein Toxins from Spore-Forming Entomopathogenic Bacteria. *Annual Review of Genetics*, 37(1), 409–433.
- De Maagd, R. A., Bravo, A., & Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*, 17(4), 193–199.
- Deng, C., Peng, Q., Song, F., & Lereclus, D. (2014). Regulation of cry gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Toxins*, 6(7), 2194–2209.
- Donovan, W. P., Engleman, J. T., Donovan, J. C., Baum, J. A., Bunkers, G. J., Chi, D. J., ... Walters, M. R. (2006). Discovery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with

- activity against coleopteran larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(4), 713–719.
- Du, J., Knowles, B. H., Li, J., & Ellar, D. J. (1999). Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic toxins in association with a phospholipid bilayer, 193, 185–193.
- Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A., & Koziel, M. G. (1996). Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93(May), 5389–5394.
- Farrand, A. J., LaChapelle, S., Hotze, E. M., Johnson, A. E., & Tweten, R. K. (2010). Only two amino acids are essential for cytolytic toxin recognition of cholesterol at the membrane surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9), 4341–4346.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4368–4371.
- Feitelson, J. S., Payne, J., & Kim, L. (1992). *Bacillus thuringiensis*: Insects and Beyond. *Nature Biotechnology*, 10, 667–674.
- Fouet, A., & Mock, M. (2006). Regulatory networks for virulence and persistence of *Bacillus anthracis*. *Current Opinion in Microbiology*, 9(2), 160–166.
- Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J. R., Pangborn, W., & English, L. (2001). Structure of the insecticidal bacterial  $\delta$ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 57(8), 1101–1109.
- Geny, B., & Popoff, M. R. (2006a). Bacterial protein toxins and lipids: pore formation or toxin entry into cells. *Biology of the Cell*, 98(11), 667–678.
- Geny, B., & Popoff, M. R. (2006b). Bacterial protein toxins and lipids: role in toxin targeting and activity. *Biology of the Cell*, 98(11), 633–651.
- Gominet, M., Slamti, L., Gilois, N., Rose, M., & Lereclus, D. (2001). Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis* plcR regulon and for virulence. *Molecular Microbiology*, 40(4), 963–975.
- Grandvalet, C., Gominet, M., & Lereclus, D. (2001). Identification of genes involved in the activation of the *Bacillus thuringiensis* inhA metalloprotease gene at the onset of sporulation. *Microbiology*, 147(7), 1805–1813.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Puzsai-Carey, M., Schwartz, J. L., Brousseau, R., & Cygler, M. (1995). *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: Crystal structure and channel formation. *Journal of Molecular Biology*, 254(3), 447–464. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0630>
- Guidelli-thuler, A. M., Abreu, I. L. De, Victor, M., & Lemos, F. (2009). Expression of the sigma 35 and cry2ab genes involved in *Bacillus thuringiensis* virulence (June), 403–409.
- Guo, S., Ye, S., Liu, Y., Wei, L., Xue, J., Wu, H., ... Rao, Z. (2009). Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *Journal of Structural Biology*, 168(2), 259–266.
- Hajajj-Ellouze, M., Fedhila, S., Lereclus, D., & Nielsen-LeRoux, C. (2006). The enhancin-like metalloprotease

- from the *Bacillus cereus* group is regulated by the pleiotropic transcriptional activator PlcR but is not essential for larvicidal activity. *FEMS Microbiology Letters*, 260(1), 9–16.
- Helgason, E., Økstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., ... Kolstø, A. B. (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* - One species on the basis of genetic evidence. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2627–2630.
- Herrero, S., González-Cabrera, J., Ferré, J., Bakker, P. L., & de Maagd, R. A. (2004). Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. *The Biochemical Journal*, 384(Pt 3), 507–513.
- Hui, F., Scheib, U., Hu, Y., Sommer, R. J., Aroian, R. V., & Ghosh, P. (2012). Structure and glycolipid binding properties of the nematocidal protein Cry5B. *Biochemistry*, 51(49), 9911–9921.
- Ibarra, J. E., & Federici, B. A. (1986). Isolation of a relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Journal of Bacteriology*, 165(2), 527–533.
- Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M., & Bulla, L. A. (2010). *Bacillus thuringiensis* A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 1(1), 31–50.
- Iriarte, J., Bel, Y., Ferrandis, M. D., Andrew, R., Murillo, J., Ferré, J., & Caballero, P. (1998). Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain. *Systematic and Applied Microbiology*, 21(1), 97–106.
- Jain, S., Ayres, C. F., de Oliveira, C. M. F., Lucena, W. A., & de Souza, J. D. A. (2008). Toxicity of a *Bacillus thuringiensis israelensis*-like strain against *Spodoptera frugiperda*. *BioControl*, 54(3), 467–473.
- Jha, A. N., Vishveshwara, S., & Banavar, J. R. (2010). Amino acid interaction preferences in proteins. *Protein Science*, 19(3), 603–616.
- Jiménez-Juárez, N., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Saab-Rincon, G., Damian-Almazo, J. Y., Gill, S. S., Bravo, A. (2007). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. *Journal of Biological Chemistry*, 282(29), 21222–21229.
- Kamgang, B., Marcombe, S., Chandre, F., Nchoutpouen, E., Nwane, P., Etang, J., ... Paupy, C. (2011). Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. *Parasites and Vectors*, 4(1), 79.
- Knowles, B. H., & Ellar, D. J. (1987). Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with different insect specificity. *BBA - General Subjects*, 924(3), 509–518.
- Knowles, H., Blatt, M. R., Tester, M., Horsnell, J. M., Menestrina, G., Ellar, D. J., & Carroll, J. (1989). A cytolytic & endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* forms cation-selective channels in planar lipid bilayers, 244(2), 259–262.
- Knowles BH, White PJ, Nicholls CN, Ellar DJ. (1992)A broad-spectrum cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis*. *Proc R Soc Ser B* ;248:1–7.
- Lee, H., Halverson, S., & Ezinwa, N. (2018). Mosquito-Borne Diseases. *Primary Care Clinics in Office Practice*, 45(3), 393–407.
- Li, J. D., Carroll, J., & Ellar, D. J. (1991). Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus*

- thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, 353(1978), 815–821.
- Li, J., Koni, P. a, & Ellar, D. J. (1996). Structure of the mosquitocidal delta-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *Journal of Molecular Biology*, 257(1), 129–152.
- Liu, N. (2015). Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annual Review of Entomology*, 60(1), 537–559.
- López-Díaz, J. A., Cantón, P. E., Gill, S. S., Soberón, M., & Bravo, A. (2013). Oligomerization is a key step in Cyt1Aa membrane insertion and toxicity but not necessary to synergize Cry11Aa toxicity in *Aedes aegypti* larvae. *Environmental Microbiology*, 15(11), 3030–3039.
- Becker, N. and Ludwig, M. (1993). Investigations on Possible Resistance in *Aedes Vexans*. (June), 221–224.
- Martin, P. A. W., Gundersen-Rindal, D. E., & Blackburn, M. B. (2010). Distribution of phenotypes among *Bacillus thuringiensis* strains. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(4), 204–208.
- Martin, P. A. W., & Travers, R. S. (1989). Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(10), 2437–2442.
- Meadows, M. P., Ellis, D. J., Butt, J., Jarrett, P., & Burges, H. D. (1992). Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(4), 1344–1350.
- Melo, A. L. de A., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2016). *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 317–326.
- Mizuki, E., Ichimatsu, T., Hwang, S. H., Park, Y. S., Saitoh, H., Higuchi, K., & Ohba, M. (1999). Ubiquity of *Bacillus thuringiensis* on phylloplanes of arboreous and herbaceous plants in Japan. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 979–984.
- Monnerat, R., Martins, E., Praça, L., Dumas, V., & Berry, C. (2012). Activity of a Brazilian Strain of *Bacillus thuringiensis israelensis* against the cotton boll weevil *Anthonomus grandis bohemian* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology*, 41(1), 62–67.
- Morse, R. J., Yamamoto, T., & Stroud, R. M. (2001). Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure*, 9(5), 409–417.
- Nisnevitch, M., Cohen, S., Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Sofer, Y., & Cahan, R. (2006). Cyt2Ba of *Bacillus thuringiensis israelensis*: Activation by putative endogenous protease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(1), 99–105.
- Okinaka, R., Cloud, K., Hampton, O., Hoffmaster, A., Hill, K., Keim, P., ... Jackson, P. (1999). Sequence, assembly and analysis of px01 and px02. *Journal of Applied Microbiology*, 87(2), 261–262.
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., Caballero, P., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6(12), 3296–3325.
- Palvannan, T., & Boopathy, R. (2005). Optimization of phosphatidylinositol-specific phospholipase C production using response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(8–9), 1393–1399.
- Peraro, M. D., & van der Goot, F. G. (2015). Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion.

*Nature Reviews. Microbiology, advance on(2), 77–92.*

- Pérez-García, G., Basurto-Ríos, R., & Ibarra, J. E. (2010). Potential effect of a putative  $\sigma$ H-driven promoter on the over expression of the Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *104*(2), 140–146.
- Pérez, C., Fernandez, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(51), 18303–18308.
- Pérez, C., Portugal, L. C., Muñoz-Garay, C., Gill, S. S., Soberón, M., Bravo, A., & Sánchez, J. (2007). *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. *Cellular Microbiology*, *9*(12), 2931–2937.
- Piggot, P. J., & Hilbert, D. W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, *7*(6), 579–586.
- Porcar, M., Grenier, A. M., Federici, B., & Rahbé, Y. (2009). Effects of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins on the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(14), 4897–4900.
- Promdonkoy, B., & Ellar, D. J. (2000). Membrane pore architecture of a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis*, *282*, 275–282.
- Promdonkoy, B., & Ellar, D. J. (2003). Investigation of the pore-forming mechanism of a cytolytic delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *The Biochemical Journal*, *374*(Pt 1), 255–259.
- Promdonkoy, B., Rungrod, A., Promdonkoy, P., Pathaichindachote, W., Krittanai, C., & Panyim, S. (2008). Amino acid substitutions in  $\alpha$ A and  $\alpha$ C of Cyt2Aa2 alter hemolytic activity and mosquito-larvicidal specificity. *Journal of Biotechnology*, *133*(3), 287–293.
- Rasko, D. A., Altherr, M. R., Han, C. S., & Ravel, J. (2005). Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Reviews*, *29*(2), 303–329.
- Reig, N., & van der Goot, F. G. (2006). About lipids and toxins. *FEBS Letters*, *580*(23), 5572–5579.
- Rodriguez-Almazan, C., Escudero, I. R. De, Cantón, P. E., Pérez, C., Gill, S. S., Soberón, M., Postal, A. (2012). The amino- and carboxyl-terminal fragments of the *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa toxin have differential roles on toxin oligomerization and pore formation. NIH Public Access, *50*(3), 388–396.
- Rojko, N., & Anderluh, G. (2015). How Lipid Membranes Affect Pore Forming Toxin Activity. *Accounts of Chemical Research*, *48*(12), 3073–3079.
- Rupar MJ, Donovan WP, Tan Y, Slaney AC. (2000). *Bacillus thuringiensis* CryET29 compositions toxic to coleopteran insects and Ctenocephalides SPP, 2000 United States Patent 6,093,695.
- Sadder, M. T., Khyami-Horani, H., & Al-Banna, L. (2006). Application of RAPD technique to study polymorphism among *Bacillus thuringiensis* isolates from Jordan. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *22*(12), 1307–1312.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., & Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, *9*(3), 283–300.
- Sayyed, A. H., Crickmore, N., & Wright, D. J. (2001). Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Is

- Toxic to the Diamondback Moth, *Plutella xylostella*, and Synergizes the Activity of Cry1Ac towards a Resistant Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5859–5861.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., ... Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 62(3), 775–806.
- Sedlak, M., Walter, T., & Aronson, A. (2000). Regulation by overlapping promoters of the rate of synthesis and deposition into crystalline inclusions of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ - endotoxins. *Journal of Bacteriology*, 182(3), 734–741.
- Sharma, R. D. (1994). *Bacillus thuringiensis*: a biocontrol agent of *Meloidogyne incognita* on Barley. *Nematologia Brasileira*.
- Shishir, A., Akter, A., Hassan, M. H., Kibria, G., Ilias, M., Khan, S. N., & Hoq, M. M. (2012). Characterization of locally isolated *Bacillus thuringiensis* for the Development of Eco-friendly Biopesticides in Bangladesh. *Journal of Biopesticides*, 5(SUPPL.), 216–222.
- Shishir, A., Roy, A., Islam, N., Rahman, A., Khan, S. N., & Hoq, M. M. (2014). Abundance and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Bangladesh and their cry genes profile. *Frontiers in Environmental Science*, 2(June), 1–10.
- 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.
- Sturman, E. J., Rydel, T. J., Zheng, M., Franklin, S., Moshiri, F., Seale, J. W., & Evdokimov, A. G. (2014). Structure of the full-length insecticidal protein Cry1Ac reveals intriguing details of toxin packaging into in vivo formed crystals. *Protein Science*, 23(11), 1491–1497.
- Tabashnik, B. E. (1992). Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(10), 3343–3346.
- Tetreau, G., Stalinski, R., David, J. P., & Després, L. (2013). Monitoring resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field by performing bioassays with each Cry toxin separately. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(7), 894–900.
- Tharad, S., Promdonkoy, B., & Toca-herrera, J. L. (2019). Lipid phase influences the binding of *Bacillus thuringiensis* Cyt2Aa2 toxin on model lipid membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1–7.
- Tharad, S., Toca-Herrera, J. L., Promdonkoy, B., & Krittanai, C. (2016). *Bacillus thuringiensis* Cyt2Aa2 toxin disrupts cell membranes by forming large protein aggregates. *Bioscience Reports*, 36(5), e00394–e00394.
- Theunis, W., Aguda, R. M., Cruz, W. T., Decock, C., Peferoen, M., Lambert, B., ... Cohen, M. B. (1998). *Bacillus thuringiensis* isolates from the Philippines: habitat distribution, delta-endotoxin diversity, and toxicity to rice stem borers (Lepidoptera : Pyralidae). *Bulletin of Entomological Research*, 88(3), 335–342.
- Thomas, W. E., & Ellar, D. J. (1983a). *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. *Journal of Cell Science*, 60, 181–197.
- Thomas, W. E., & Ellar, D. J. (1983b). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* insecticidal endotoxin. *FEBS Letters*, 154(2).



- Tolle, M. A. (2009). Mosquito-Borne Diseases. *Primary Care -Clinics in Office Practice*, 39, 97–140.
- Torres-Quintero, M.-C., Gómez, I., Pacheco, S., Sánchez, J., Flores, H., Osuna, J., ... Bravo, A. (2018). Engineering *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa toxin specificity from dipteran to lepidopteran toxicity. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12.
- Walters, F.S., English, L.H., 1995. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins toward the potato aphid in an artificial diet bioassay. *Entomol. Exp.* 77, 211–216
- Wang, J., Mei, H., Qian, H., Tang, Q., Liu, X., Yu, Z., & He, J. (2013). Expression profile and regulation of spore and parasporal crystal formation-associated genes in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Proteome Research*, 12(12), 5487–5501.
- Wirth, M. C., & Walton, W. E. (2000a). Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* Restores Toxicity of *Bacillus sphaericus* Against Resistant *Culex quinquefasciatus* ( Diptera : Culicidae ), 401–407.
- Wirth, M. C., & Walton, W. E. (2000b). Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* Restores Toxicity of *Bacillus sphaericus* Against Resistant *Culex quinquefasciatus* ( Diptera : Culicidae ), 66(3), 401–407.
- Xavier, R., Josephine, R. , C.M., & Sreeramanan, S. (2017). Environmental distribution and diversity of insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis berliner*. *Malaysian Journal of Microbiology*, 3(2), 1–6.

## ANEXO

- Datos empleados para la obtención de la dosis letale media (LC<sub>50</sub>) de las variantes de Cyt1Aa obtenidas en el presente trabajo.

Variante	Concentraciones empleadas para evaluar toxicidad / LC <sub>50</sub> (ng/ml)
Cyt1Aa	100 200 500 700 900 1200 1500 1800
N89C	500 2500
A88C	20 50 80 100 200 500 900 1200
E86C	150 200 300 600 900 1200 1500 1800 2000
L85C	1500 3000
K83C	100 200 400 600 800 1000 1200 1500
A65C	1500 3000
A59C	200 500 1000 1500 2000 2200 2500 3000 3500
A55C	100 200 500 800 1000 1200 1500

**Tabla 7.** Valores de concentración de las variantes de Cyt1Aa empleadas para el bioensayo en larvas del 4to estadio de *A. aegypti* y para la obtención de la dosis letal media (LC<sub>50</sub>). Las variantes en azul son aquellas que no fueron tóxicas con *A. aegypti* en los bioensayos.