



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CONSTRUCCIÓN DE VARIANTES DE LA TOXINA Cyt1Aa DE
Bacillus thuringiensis PARA MIGRAR SU TOXICIDAD HACIA
INSECTOS LEPIDÓPTEROS.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

M. en B. MARY CARMEN TORRES QUINTERO

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Alejandra Bravo de la Parra – Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Humberto Flores Soto – Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Humberto Lanz Mendoza – Instituto Nacional de Salud Pública

Cuernavaca, Morelos. Noviembre, 2018.



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.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LA UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. ALEJANDRA BRAVO DE LA PARRA, CON EL FINANCIAMIENTO DE LA BECA CONACyT 258757.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a:

Álvaro A. García Torres, por ser el motor que me ha impulsado a seguir adelante, por hacerme ver que cada día es especial y sobre todo por el amor incondicional que me has dado durante todo este camino, gracias por existir, TE AMO.

Leticia Quintero Carmona y Fco. Javier Torres Polanco, por todo el apoyo que me han brindado durante toda mi vida, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me han brindado y que me ha permitido ser una persona de bien y sobre todo por estar con migo en todo momento, LOS AMO.

Marily Torres Quintero, por todo el apoyo incondicional que siempre me has brindado y por estar con migo cuando más lo necesitaba, TE AMO.

Jesús por toda la fortaleza y salud que me ha dado durante toda mi vida, por acompañarme en cada paso que doy y por no dejarme sola ni un solo instante, GRACIAS.

AGRADECIMIENTOS

En toda esta aventura, muchas han sido las personas que de una u otra forma me han ayudado para poder concluir con mi proyecto de tesis, a todas ellas les agradezco su apoyo incondicional hacia mi persona.

A la **Dra. Alejandra Bravo de la Parra**, por su invaluable ayuda, guía y sobre todo por su paciencia y comprensión desde que comencé hacer este trabajo. También le agradezco de una manera muy especial por darme consejos que me han ayudado a forjar mi camino. Muchas gracias.

Al **Dr. Mario Soberón Chávez**, por dedicar parte de su tiempo para hacer las observaciones y correcciones pertinentes al trabajo, las cuales ayudaron a mejorar la presentación de este. Gracias por todo el apoyo incondicional.

Al **Dr. Humberto Flores Soto**, por su valiosa colaboración y sugerencias, por dedicar parte de su tiempo para hacer las observaciones y correcciones pertinentes al trabajo, las cuales ayudaron a mejorar la presentación de este. Muchas gracias por todas sus atenciones y por compartir parte de sus experiencias con migo, por hacerme ver que las cosas no son tan difíciles como parecen y por todo el apoyo incondicional.

Al **Dr. Humberto Lanz Mendoza**, por sus valiosos consejos, críticas y sugerencias hacia el trabajo, y sobre todo por su apoyo para poder realizar y concluir este proyecto. Muchas gracias por todas sus atenciones.

Al **Dr. Sabino Pacheco**, por haber aceptado formar parte de este proyecto, por su apoyo incondicional en todo momento, por toda la atención, críticas y sugerencias que contribuyeron al mejoramiento del trabajo, Muchas Gracias.

A la **Dra. Isabel Gómez**, por sus comentarios, sugerencias, críticas al trabajo, así como su disponibilidad y apoyo incondicional hacia mi persona. Muchas Gracias.

Al **Biol. Jorge Sánchez**, por sus valiosos consejos, sugerencias y críticas pertinentes hacía el trabajo y sobre todo por dedicarme parte de su tiempo cada

vez que me acerqué a él cuándo tuve alguna duda. Muchas gracias por compartir parte de tus experiencias conmigo y por hacerme ver que para conseguir algo no hay que correr, al contrario ir despacio pero con paso firme y disfrutar lo que la vida nos ofrece. Gracias por ser mi maestro, un excelente compañero de trabajo y sobre todo por ser mí amigo.

A los doctores **Ernesto Ortiz Suri, Gloria Saab Rincón, Clarita Olvera Carranza, Guadalupe Espín Ocampo y Mario Henry Rodríguez López**, por las sugerencias y correcciones pertinentes al manuscrito de la tesis. Gracias por ayudar a consolidar mi proyecto de doctorado.

Al **Dr. Iván Arenas Sosa**, por sus valiosos consejos, sugerencias, y por dedicarme parte de su tiempo cada vez que me acerqué con alguna duda. Muchas gracias por compartir parte de tus experiencias conmigo y por la ayuda incondicional. Gracias por ser mi maestro y sobre todo por ser mí amigo.

Al **Dr. Marco Díaz**, por sus valiosos consejos, críticas y sugerencias hacia el trabajo, y por su apoyo incondicional. Muchas gracias por todas sus atenciones y amistad.

A mis amigos y profesores, **Dr. Guadalupe Peña, Dr. Víctor Manuel Velázquez, Dra. Patricia Trujillo, Dr. Augusto Ramírez, M en C. Adriana G. Trejo y M en C. Laura Lina**, gracias por toda la ayuda incondicional hacia mi persona, por estar ahí para mí en los momentos más difíciles de mi vida, por brindarme su mamo y no soltarme en el camino. Gracias por todos los consejos que me brindaron durante toda mi carrera. Sin ustedes, hubiera sido muy complicado poder concluir con esta meta. Son y serán... siempre una parte fundamental de mi formación tanto académica como personal.

Rosa María Gama, gracias por formar parte de mi vida y darme la oportunidad de formar parte de la tuya, gracias por esos momentos de alegría y confidencialidad en todo momento, eres un pilar clave en mi vida.

A mis amigos y compañeros que formaron parte de toda esta aventura:

Roxana, Laura, Yesi, Bety, Arlen, Paulina, Zeyu, Josué, Leivi, Emiliano, Jannet, Cristina, Nathalia, Nathaly, Diana, Fernando Zuñiga, David Garcias, Blanca Inés, Jorge García, Carmen Rivas, Carmenxius, Fernando Bonilla, David Rea, Irene, Lety, Yare, Rubén Tinoco, Gaby, Raquel, Calef, Víctor Hugo, Daniela, Catalina, Luisa. Gracias a todos y a cada uno de ustedes por todo su apoyo, comprensión y consejos que me han brindado durante todo este tiempo. Muchas gracias por hacer este camino maravilloso y por supuesto por todos aquellos momentos agradables en las horas de trabajo y convivencia social.

Un agradecimiento a Liz Cabrera, Graciela Domínguez, Alejandro Uribe, Sergio Blancas, por todo el apoyo en el laboratorio y por aquellas pláticas que amenizaron las horas de trabajo.

Muchas gracias a Gloria Villa, Antonio Guillén y Jalil Saab, por todo el apoyo en las cuestiones administrativas y proceso de titulación.

Agradezco al Programa de Apoyos de Estudios de Posgrado (PAEP) por los recursos otorgados para la asistencia a los congresos:

- XXXI Congreso Nacional de Bioquímica. Aguascalientes 2016.
- SIP. Presentation at the Society for Invertebrate Pathology annual meeting in San Diego, California, USA. 2017.
- Simpósio de Controle Biológico. Ribeirao Preto, Brasil. 2017.

Finalmente a todas aquellas personas que en algún momento dado me brindaron su apoyo y que por mi corta memoria olvidé mencionar, también les agradezco de manera especial.

Mary Carmen Torres Quintero

INDICE

	Página
Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tablas.....	vi
Abreviaturas.....	vii
Abstract.....	ix
Resumen.....	xi
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Características de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt).....	3
1.1. 2. Toxinas Cry.....	5
1.1.2.1. Mecanismo de acción de las toxinas Cry.....	7
1.1.3. Toxinas Cyt.....	10
1.1.3.1. Mecanismo de acción de las toxinas Cyt.....	11
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1. Ingeniería de las toxinas Cry.....	14
2.2. Ingeniería de las toxinas Cyt.....	17
3. JUSTIFICACION.....	20
4. HIPOTESIS.....	21
5. OBJETIVOS.....	21
5.1. Objetivo General.....	21
5.2. Metas particulares.....	21
6. MATERIALES Y METODOS.....	22
6.1. Cepas bacterianas.....	22
6.2. Medios de Cultivo.....	24
6.3. Selección de los sitios que se utilizaron para generar las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab....	25
6.4. Construcción de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab.....	27
• Transformación en células electrocompetentes de <i>E. coli</i> DH5α....	28
• Transformación en células quimiocompetentes de <i>E. coli</i> SCS110.....	28
• Transformación en células acristalíferas 407- de <i>Bacillus thuringiensis</i>	29
6.5. Obtención de los cristales de las toxinas Cry11Aa, Cyt1Aa y de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab.....	32
• Purificación mediante gradientes de sacarosa.....	32
• Purificación mediante el sistema acuoso de dos fases.....	33

6.6. Solubilización de los cristales de las toxinas Cyt1A y de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab.....	33
6.7. Activación de las protoxinas de Cyt1Aa y de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab.....	34
6.8. Inmunoblot.....	34
6.9. Ensayos de unión de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab a los receptores CDR, APN y ALP de <i>M. sexta</i>	35
6.10. Ensayos de la actividad hemolítica de las toxinas Cyt1Aa y de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab.....	36
6.11. Bioensayos de toxicidad de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab en larvas de <i>M. sexta</i> , <i>P. xylostella</i> y <i>A. aegypti</i>	38
• Bioensayos en <i>M. sexta</i> y <i>P. xylostella</i>	38
• Bioensayos en <i>A. aegypti</i>	39
7. RESULTADOS	41
7.1. Construcción y expresión de las variantes de las toxinas Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab.....	41
7.2. Análisis de la estabilidad de las variantes las toxinas Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab.....	43
7.3. Inmunodetección de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab.....	46
7.4. Ensayos de unión de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab a los receptores APN, ALP y CDR.....	47
7.5. Ensayos de toxicidad de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 en Larvas de <i>M. sexta</i> , <i>P. xylostella</i> y <i>A. aegypti</i>	49
7.5.1. Toxicidad en Larvas de <i>M. sexta</i> y <i>P. xylostella</i>	49
7.5.2. Toxicidad en larvas de <i>A. aegypti</i>	52
7.6. Efecto sinérgico de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab en larvas de <i>A. egypti</i>	53
7.7. Actividad hemolítica de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab.....	56
8. DISCUSIÓN	58
9. CONCLUSIONES	70
10. PERSPECTIVAS	71
REFERENCIAS	72

ANEXO 1 Y 2. SINTOMAS DE INFECCION EN <i>M. sexta</i> A LOS 7 Y 14 DIAS DESPUES DE SER EXPUESTAS A LAS VARIANTES DE LA TOXINA Cyt1Aa.....	83
ANEXO 3 PUBLICACION DERIVADA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	86

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esporas y cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	4
Figura 2. Estructura terciaria de las toxinas Cry1aA, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry4Ba, Cry3Bb1, Cry4Aa, Cry4Ba y Cry8Ea1.....	6
Figura 3. Sitios de interacción de la toxina Cry1Ab a los receptores ALP, APN y Caderina (CDR).....	8
Figura 4. Modo de acción de las toxinas Cry.....	9
Figura 5. Estructura terciaria de las toxinas Cyt1Aa, Cyt2Aa y Cyt2Ba.....	11
Figura 6. Modo de acción de las toxinas Cyt.....	12
Figura 7. Sitios de inserción del péptido GBP3.1 en la secuencia de Cyt2Aa.....	18
Figura 8. Secuencia peptídica de la toxina Cyt1Aa con los sitios de inserción para el asa 2 o 3 de Cry1Ab.....	26
Figura 9. Estrategia para introducir el asa 2 o asa 3 de Cry1Ab en las distintas asas de la toxina Cyt1Aa.....	30
Figura 10. Separación y concentración de los cristales de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 3 o asa 2 de Cry1Ab.....	42
Figura 11. Solubilización de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o asa 3 de Cry1Ab.....	44
Figura 12. Activación de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o asa 3 de Cry1Ab.....	45
Figura 13. Inmunodetección de las variantes de las toxinas Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o asa 3 de Cry1Ab.....	46
Figura 14. Ensayos de unión de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o asa 3 de Cry1Ab en distintas asas de la toxina Cyt1Aa a los receptores APN, ALP, CRDR de <i>M. sexta</i>	48

Figura 15. Porcentaje de mortalidad en larvas de <i>M.sexta</i> y <i>P. xylostela</i> al ser expuestas a las variantes de la toxina Cyt1Aa que contienen el asa 2 o asa 3 de Cry1Ab en las distintas asas de la toxina Cyt1Aa.....	51
Figura 16. Porcentaje de mortalidad de la mezcla de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o asa 3 de Cry1Ab con la toxina Cry11Aa silvestre.....	54
Figura 17. Actividad hemolítica de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o asa 3 de Cry1Ab en eritrocitos de conejo.....	57
Figura 18. Estructura tridimensional de la toxina Cyt1Aa (PDB 3RON).....	66

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Especies de lepidópteros que han generado resistencia a diferentes toxinas de Bt.....	2
Tabla 2. Toxicidad de la toxina Cyt1Aa-BinA híbrida en larvas de 4to instar de <i>Anopheles gambiae</i> , <i>Anopheles stephensi</i> , <i>Aedes aegypti</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i>	17
Tabla 3. Mortalidad en <i>M. persicae</i> , <i>A. pisum</i> y <i>A. aegypti</i> ocasionada por las cinco toxinas híbridas.....	19
Tabla 4. Oligos mutagénicos para la inserción del asa 3 de Cry1Ab.....	31
Tabla 5. Oligos mutagénicos para la inserción del asa 2 de Cry1Ab.....	30
Tabla 6. Porcentaje de mortalidad de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen las asas 3 y asa 2 de Cry1Ab en larvas de <i>A. aegypti</i> a las 24 h.....	53
Tabla 7. Sinergismo entre las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción de las asas 3 y 2 de Cry1Ab con la toxina Cry11A en larvas de <i>A. aegypti</i>	55

ABREVIATURAS

407 Bt: Cepa acristalífera de *Bacillus thuringiensis*.
ADN: Acido desoxirribonucleico.
ALP: Receptor Fosfatasa Alcalina.
APN: Receptor Aminopeptidasa.
BBM: Microvellosidades de las membranas de las células apicales del intestino (por sus siglas en inglés Brush Border Membrane).
BSA: Albúmina de suero bovino (por sus siglas en inglés Bovine serum albumin)
Bt: *Bacillus thuringiensis*.
C₆H₈O₇: Acido cítrico.
CDR: Receptor Caderina.
CL₅₀: Concentración letal media.
cm²: Centímetro cuadrado.
Dam/Dcm: Metilasas presentes en la mayoría de las cepas de *E. coli*.
DE₅₀: Dosis efectiva media.
DO: Densidad óptica.
DpNI: Endonucleasa específica que corta DNA metilado y hemimetilado.
DTT: Ditioneitol.
E. coli: *Escherichia coli*.
EDTA: Acido etilendiamintetra-acético.
FS: Factor de sinergismo.
gr: Gramos.
h: Hora.
H₂O: Agua.
HBI: Caldo de infusión cerebro-corazón (por sus siglas en inglés Brain Heart Infusion).
HCT: Medio de esporulación.
K₂HPO₄: Fosfato ácido dipotásico.
Kd: Constante de afinidad.
KH₂PO₄: Fosfato monoácido de potasio.
LB: Luria Bertani.
min: Minutos.
Na₂HPO₄: Fosfato de sodio dibásico.
Na₃C₆H₅O₇: Citrato de sodio.
NaCl: Cloruro de Sodio.
NaH₂PO₄: Fosfato de sodio monobásico.
nm: Nanometros.
nM: Nanomolar.
OGM: Organismos genéticamente modificados.
OPD: Orto fenil diamina.
pb: Pares de bases nucleotídicas.
PBS: Solución salina con tampón de fosfatos.
PBST: Solución salina con tampón de fosfatos con monolaurato de polioxietilen(20)sorbitano (Tween).
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
PEG: Polietilenglicol.

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

PVDF: Fluoruro de polivinilideno.

rpm: Revoluciones por minuto.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (por sus siglas en inglés sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).

SOC: Medio de caldo superóptimo con represión por catabolito.

SPR: Resonancia por plasmones superficiales (por sus siglas en inglés Surface plasmon resonance).

TTN: Tritón/Tris/Cloruro de Sodio.

v/v: Volumen/ Volumen.

w/w: Peso /Peso.

μl: Microlitros.

ABSTRACT

In this work, we describe the migration of Cyt1Aa toxicity from dipteran to lepidopteran insects by constructing Cyt1Aa-hybrid toxins containing the sequence of Cry1Ab domain II loop 3 (CytL3-Loopn) and loop 2 (CytL2-Loopn). The hypothesis behind the construction of these hybrid toxins is that providing a binding site that recognizes gut proteins in lepidopteran larvae would result in Cyt1Aa-hybrid proteins that display toxicity against several lepidopteran species. Based on the three-dimensional structure of the Cyt1Aa toxin, we identified twelve exposed loop regions. We selected ten of these loops to insert the amino acid sequence of the Cry1Ab domain II loop 3 (FRSGFSNSSVSI) and three to insert the loop 2 (SSTLYRRPFNI). We did not insert the peptide sequence into loops 11 and 12 of Cyt1Aa since it was previously shown that these loops were involved in the binding interaction and synergism Cyt1Aa with Cry11Aa and Cry4Ba toxins. The selected ten loops in the Cyt1Aa structure are exposed to the solvent. The constructs in loops 1, 2 and 3 of Cyt1Aa did not produce protein in Bt and were not further analyzed. The crystal-like inclusions from the remaining constructions were purified and the protoxins were solubilized and activated with trypsin. We analyzed the binding of Cyt1Aa-hybrid variants to recombinant *M. sexta* APN, ALP and CDR by ELISA binding assays. The variants CytL3-Loop6, CytL3-Loop7, CytL3-Loop9, CytL2-Loop6, CytL2-Loop7 and CytL2-Loop9 showed significant binding to the three receptor proteins, showing 2 to 7 fold higher binding to ALP; 2 to 8 fold higher binding to APN, and 1.5 to 4 fold higher binding to CDR when compared with the binding of the control Cyt1Aa toxin (ANOVA, $P < 0.0001$). Test to analyze the toxicity of the ten hybrid-Cyt1Aa mutants and the Cyt1Aa were performed against two different lepidopteran species, first instar *M. sexta* and third instar *P. xylostella* larvae. We observed that after seven days of treatment the larvae of both insects were still alive but showed to be severely affected when treated with some hybrid Cyt1Aa toxins in contrast with wild type Cyt1Aa. The treated larvae were pale and showed a significant reduced size in comparison with the water control or the larvae treated with Cyt1Aa. However, after 14 days of exposure to the toxins the mortality induced by some hybrid Cyt1Aa proteins was evident. The statistical

analysis of the data indicated that constructions CytL3-Loop6, CytL3-Loop7, CytL3-Loop9, CytL2-Loop6, CytL2-Loop7 and CytL2-Loop9 showed significant mortality values that ranged from 60–80% and were significantly more toxic than the other constructions CytL3-Loop4, CytL3-Loop5, CytL3-Loop8 and CytL3-Loop10 and the control with Cyt1Aa (ANOVA, $P < 0.0001$). In addition, we evaluated the toxicity of hybrid-Cyt1Aa mutants against *A. aegypti* larvae. The medium lethal concentration of wild type Cyt1Aa was 146.2 ng/ml (32–253, ng/mL). In contrast, the hybrid-Cyt1Aa mutants showed no toxicity against *A. aegypti* even at 10 µg/ml. However, these Cyt1Aa-hybrid proteins were still capable to potentiate the Cry11Aa toxic activity, showing values of mortality above 95% when the Cyt1Aa-hybrid proteins and Cry11Aa were assayed together in the same mixture. On the other hand, these constructions showed low hemolytic activity against rabbit red blood cells, in contrast with Cyt1Aa wild type that showed a medium effective (EC_{50}) dose of 190 ng/mL (182.4–197.8 ng/mL).

Here we prove, for the first time, that the exchange of loops that are involved in insect specificity among toxins that are not structurally related could result in the generation of novel hybrid proteins with changes in their insect specificity. These toxins represent interesting alternatives to counter insect resistance to Cry toxins. These data also indicate that Cyt1Aa toxin is able to accept additional protein sequences and produce active proteins, suggesting that in the future; other hybrid Cyt toxins could be constructed containing additional domains that could also effectively enhance a lethal effect of Cyt toxin against other targets. The construction of novel hybrid Cyt toxins that could be able to potentiate the insecticidal activity of other Cry toxins, such as Cry1A is our goal for future research.

RESUMEN

Este proyecto se enfocó en analizar si es posible cambiar la especificidad de las toxinas Cyt1Aa de insectos Dípteros a insectos Lepidópteros por medio de la construcción de variantes de la toxina Cyt1Aa que tengan la inserción del asa 3 y asa 2 del Dominio II de Cry1Ab (regiones importantes para la interacción de la toxina Cry1Ab a los receptores Aminopeptidasa (APN), Fosfatasa Alcalina (ALP) y Caderina (CDR) presentes en las BBM apicales del intestino medio de *Manduca sexta*. La hipótesis fue que estas variantes al contener regiones que reconocen receptores presentes en Lepidópteros, podrían inducir la unión de estas toxinas a los receptores APN, ALP y CDR de *M. sexta* e inducir actividad insecticida a lepidópteros. Con base en la estructura tridimensional de la toxina Cyt1Aa, se identificaron 12 sitios potenciales, sin embargo, solo se seleccionaron 10 de ellos para llevar a cabo la inserción del asa 3 (FRSGFSNSSVSI) y tres para la inserción del asa 2 (SSTLYRRPFNI); los sitios para la inserción del asa 2 fueron seleccionados con base a los resultados obtenidos con las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 3. Las asas 11 y 12 de la toxina Cyt1Aa no fueron seleccionadas debido a que previamente se mostró que estas dos regiones se encuentran involucradas en la unión y sinergismo de la toxina Cyt1Aa con las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa. Las asas que fueron seleccionadas en la toxina se encuentran expuestas al solvente. La inserción del asa 3 de Cry1Ab en las asas 1, 2 y 3, no resultaron en proteínas estables, por lo que no fueron analizadas en el proyecto. Los cristales producidos por el resto de las variantes de la toxina Cyt1Aa fueron purificados y las protoxinas fueron solubilizadas y activadas. La unión de las variantes de la toxina Cyt1Aa con la inserción del asa 2 o asa 3 a los receptores APN, ALP y CDR se llevó a cabo mediante ensayos de ELISA. Estos resultados mostraron que las variantes de la toxina Cyt1Aa con la inserción del asa 3 y asa 2 en las asas 6, 7 y 9 de la toxina (CytA3-Asa6, CytA3-Asa7, CytA3-Asa9, CytA2-Asa6, CytA2-Asa7 y CytA2-Asa9) mostraron unión significativa a los tres receptores, mostrando un incremento de 2 a 7 veces al receptor ALP; de 2 a 8 veces al receptor APN y de 1,5 a 4 veces al receptor CDR comparado con la toxina Cyt1Aa silvestre y el resto de las variantes (ANOVA, $P < 0.0001$). La

toxicidad de las variantes de la toxina Cyt1Aa y de la toxina Cyt1A silvestre fue evaluada en larvas de dos especies de lepidópteros (*Manduca sexta* y *Plutella xylostella*). Al llevar a cabo los bioensayos con el complejo espora-cristal de cada una de las variantes en ambas especies, se observó que a los siete días, estas causan baja toxicidad, sin embargo, algunas variantes afectaron el desarrollo de las larvas, las cuales presentaron cambios en la coloración de la piel y reducción en el tamaño comparadas con las larvas que fueron expuestas al agua o a la toxina Cyt1A silvestre. Después de 14 días de haber sido expuestas a las variantes de la toxinas Cyt1Aa la mortalidad con algunas variantes fue evidente tanto en *M. sexta* como en *P. xylostella*, resultados similares se observaron para las variantes con la inserción del asa 2. El análisis de ANOVA ($P < 0.0001$) de los datos de las toxinas con la inserción del asa 2 o asa 3, indica que las variantes en las asas 6, 7 y 9 de la toxina Cyt1Aa muestran diferencias significativas en comparación con el resto de las variantes y los controles. De igual manera, se analizó la toxicidad de estas variantes en larvas de *Aedes aegypti*, la toxicidad de la toxina Cyt1Aa silvestre fue de 146.2 ng/ml (32 -253, ng/mL), mientras que las variantes de la toxina Cyt1Aa con la inserción del asa 2 o asa 3 no mostraron toxicidad ni a una concentración alta de toxina (10 µg/ml). Sin embargo, se observó que las variantes de la toxina Cyt1Aa aún son capaces de potenciar la actividad tóxica de Cry11Aa, mostrando un incremento del 95% de mortalidad cuando ambas proteínas (variantes de la toxina Cyt1Aa + Cry11Aa) fueron evaluadas de manera conjunta en la misma mezcla. Por otro lado, se evaluó la actividad hemolítica de cada una de las variantes en eritrocitos de conejo, los resultados muestran que las variantes poseen una actividad hemolítica reducida, en comparación con la toxina Cyt1Aa silvestre en donde la concentración efectiva media (CE_{50}) fue de 190 ng/mL (182.4–197.8 ng/mL).

En este trabajo, mostramos por primera vez, que el intercambio de regiones involucradas en la especificidad en insectos entre toxinas que no se encuentran relacionadas estructuralmente podría proporcionar una estrategia efectiva para cambiar la especificidad de las toxinas y en un futuro proporcionar herramientas que permitan contrarrestar la resistencia que han generado algunas especies de

insectos a las toxinas Cry de Bt. Estos datos sugieren que la toxina Cyt1Aa quizás es capaz de aceptar dominios más grandes y resultar en toxinas activas. Por lo que en un futuro se podrían construir toxinas que contengan dominios completos con la finalidad de incrementar su actividad tóxica y migrar su toxicidad a otros grupos de insectos, así como, generar variantes de Cyt1Aa capaces de sinergizar a otras toxinas Cry como las toxinas Cry1Aa activas contra insectos lepidópteros, como una estrategia para contender con resistencia a toxinas Cry en este tipo de insectos.

1. INTRODUCCIÓN.

El control de insectos plaga de importancia agrícola y de aquellos que son considerados vectores de enfermedades para el hombre, se ha dado principalmente por la utilización de compuestos químicos, sin embargo, la aplicación de este método convencional no siempre proporciona resultados favorables. Por otro lado, el uso intensivo e indiscriminado de estos compuestos ha ocasionado el desarrollo de resistencia en los insectos y ha propiciado la contaminación de ecosistemas a raíz de la acumulación de estas sustancias cuya degradación es lenta. Así mismo, ha ocasionado daños a la salud del hombre y a organismos benéficos, por tal motivo, se ha implementado la búsqueda de productos que sean menos dañinos, pero que presenten la misma eficacia en cuanto al control de insectos plaga (Lacey, *et al.*, 2001; Ibarra, *et al.*, 2006). Una alternativa a lo anterior, es la utilización de compuestos formulados en base a microorganismos (hongos, bacterias, virus y/o protozoarios), los cuales presentan muchas ventajas en comparación con los insecticidas químicos convencionales, ya que son inocuos para los humanos y otros organismos benéficos, reducen la cantidad de residuos químicos en el ambiente, permiten la conservación de otros enemigos naturales y ayudan a preservar la biodiversidad en los ecosistemas (Lacey, *et al.*, 2001).

En un inicio, los hongos fueron los primeros microorganismos usados como agentes de control microbiano, sin embargo, el auge de esta disciplina se dio cuando se comenzó a utilizar la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) que produce proteínas tóxicas para los insectos (Lacey, *et al.*, 2001; Federici y Bauer, 2005). Hoy en día Bt es uno de los microorganismos más utilizados para el control de plagas agrícolas y de insectos vectores de enfermedades en humanos (Rosell, *et al.*, 2008; Sanahuja, *et al.*, 2011). El interés por esta bacteria surgió cuando se descubrió que presentaba actividad insecticida, ya que durante su fase de esporulación, ésta produce unas inclusiones cristalinas formadas por varios tipos de protoxinas, denominadas δ -endotoxinas, las cuales le confieren su toxicidad

(Bechtel y Bulla, 1976; Schnepf, *et al.*, 1998; Sanahuja, *et al.*, 2011). Sin embargo, su efectividad en la última década se ha visto reducida, debido a que algunas especies de lepidópteros ya han sido capaces de desarrollar resistencia hacia este grupo de toxinas (Tabashnik y Carrière, 2017). En la Tabla 1 se muestran algunas especies de lepidópteros que han desarrollado resistencia a la aplicación de algunas toxinas de Bt (Peterson, *et al.*, 2017).

Tabla 1. Especies de lepidópteros que han generado resistencia a diferentes toxinas de Bt (Peterson, *et al.*, 2017).

Lepidóptero	Toxina	País	Lepidóptero	Toxina	País
<i>Bombyx mory</i>	Cry1Ab	China	<i>Pectinophora gossypiella</i>	Cry1Ac, Cry1Aa, Cry1Bb.	EUA, India.
<i>Diatraea saccharalis</i>	Cry1Ab	EUA	<i>Plodia interpunctella</i>	Cry1Ac, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ca, Cry1Da.	EUA
<i>Epehstia kuehniella</i>	Cry1Aa, Cry1A, Cry1Ac, Cry2Aa	Australia	<i>Plutella xylostella</i>	Cry1Ac, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ca, Cry1Da, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2B, Cry1Fa, Cry1Ja.	Brasil, China, Malasia, Filipinas, EUA, Japón.
<i>Helicoverpa armigera</i>	Cry2Ab, Cry2A, Cry2Ae, Cry1A, Cry1Ab.	Australia, China, India	<i>Sesamia inferens</i>	Cry1Ab, Cry1Ac,	China
<i>Helicoverpa punctigera</i>	Cry2Ab, Cry2Ae.	Australia	<i>Spodoptera exigua</i>	Cry1Ab, Cry1Ca, Cry1H, Cry2A, Cry1Ac, Cry1Aa, Cry1Ca, Cry1Da.	EUA
<i>Helicoverpa zea</i>	Cry1Ac, Cry1Ab.	EUA	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Cry1Fa, Cry1Ab, Cry1Ac.	EUA
<i>Heliiothis virescens</i>	Cry1Ac, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1B, Cry1C, Cry2Aa, Cry1Fa.	EUA	<i>Spodoptera littoralis</i>	Cry1C	Israel
<i>Ostrinia furnacalis</i>	Cry1Ac	China	<i>Spodoptera litura</i>	Cry1C	India
<i>Ostrinia nubilalis</i>	Cry1Ab, Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1F.	EUA, Italia.	<i>Trichoplusia ni</i>	Cry1Ac	Canada

Con base en lo anterior, se han implementado distintas estrategias que potencien la actividad de las toxinas de Bt; dentro de ellas encontramos el uso de proteínas adicionales como quitinasas, toxinas Cyt, fragmentos del receptor

caderina (receptor importante para la unión de las toxinas Cry) o inhibidores de proteasas (Pardo-López, *et al.*, 2009). Sin embargo, una de las estrategias más efectivas ha sido la modificación de genes que codifican para toxinas insecticidas por medio de técnicas de ingeniería genética; estas técnicas han proporcionado a la humanidad un poder sin precedentes para dirigir la evolución de nuevos genes con nuevas características. En este sentido, la mutagénesis sitio-dirigida, la introducción de sitios de corte en distintas regiones de la proteína, la delección o inserción de fragmentos pequeños de aminoácidos en los distintos genes de las toxinas Cry de Bt, han permitido revertir la resistencia o mejorar la toxicidad contra insectos plaga de importancia agrícola (Dar, *et al.*, 2017).

1.1. Características de *Bacillus thuringiensis* (Bt).

Bt es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta, inocua para vertebrados e insectos benéficos, ha sido aislada de suelo, hojas, agua, telarañas e insectos muertos (Schnepf, *et al.*, 1998; Hong, *et al.*, 2005). Es la más ampliamente estudiada y utilizada dentro del grupo de las bacterias entomopatógenas. La toxicidad de esta bacteria hacia insectos se debe principalmente a dos grupos de proteínas denominadas δ -endotoxinas (Cry y Cyt). Estas proteínas se sintetizan durante la fase de esporulación de su ciclo de vida, formando cuerpos cristalinos paraesporales en el compartimiento de la célula (Schnepf, *et al.*, 1998). La naturaleza proteica y su alta especificidad hacia algunos insectos las coloca como una alternativa insecticida ecológica debido a que son totalmente biodegradables y no dañan a otros organismos.

Aun cuando las toxinas Cyt y Cry son muy efectivas, solo algunas cepas Bt han sido usadas para el desarrollo de productos insecticidas, representando alrededor del 2% del total de los productos insecticidas que se encuentran en el mercado. Algunos genes *cry* han sido introducidos en el genoma de cultivos vegetales generando organismos genéticamente modificados (OGM) que resultan

muy efectivos contra ciertas plagas de importancia agrícola y disminuyen la aplicación de los productos insecticidas químicos que actualmente se utilizan en campo (James, 2017).

Una de las cepas más utilizadas a nivel mundial en el control de insectos es la variedad *Bt. subsp. israelensis* (Figura 1) la cual produce cuatro toxinas Cry (Cry11Aa, Cry10Aa, Cry4Ba y Cry4Aa) y dos toxinas Cyt (Cyt1Aa y Cyt2Ba) las cuales son tóxicas para mosquitos, que son vectores de enfermedades humanas como la malaria, la fiebre amarilla, el dengue, chikungunya, zica y virus del Nilo (Höfte y Whiteley, 1989; Berry, *et al.*, 2002; Murray *et al.*, 2013).

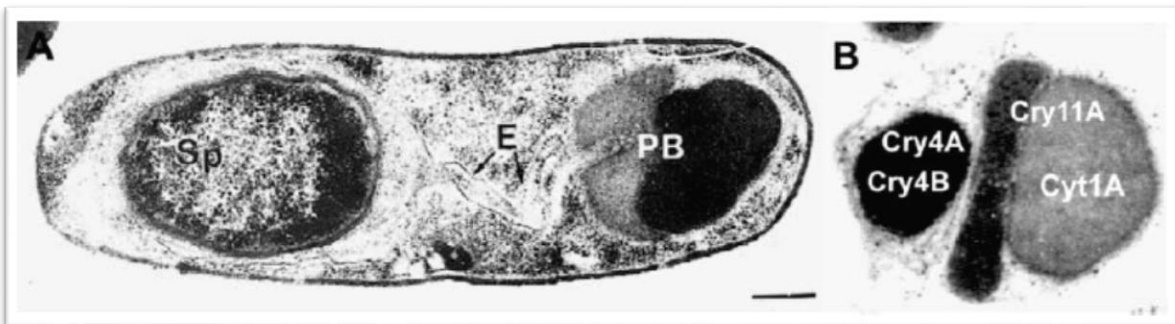


Figura 1. (A) Esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. SP: Espora, E: Exoespora, PB: Cuerpos cristalinos paraesporales que contiene las toxinas: Cry11Aa, Cry10Aa, Cry4Ba, Cry4Aa, Cyt1Aa y Cyt2Ba. (B) Cuerpo paraesporal mostrando de manera individual cada una de las toxinas. Escala 1 μm . Tomada de Federici *et al.*, 2003.

Las toxinas Cry y Cyt tienen estructuras y mecanismos de acción diferentes y una de las características más importantes de las toxinas Cyt es su capacidad de potenciar la actividad insecticida de las toxinas Cry4 y Cry11 (Pérez, *et al.*, 2005). Esta combinación de toxinas resulta muy interesante ya que a pesar de su uso por varias décadas en el campo aún no se ha desarrollado resistencia en las poblaciones de mosquitos, lo que reafirma su lugar como alternativa efectiva al uso de insecticidas químicos. Entender el mecanismo de sinergismo entre estas toxinas es una pregunta fundamental que podría permitir establecer estrategias de control más efectivas. Esta información podría ayudar a establecer estrategias

para potenciar otras toxinas Cyt y/o Cry activas contra otros órdenes de insectos, así como para el control de insectos resistentes a toxinas Cry.

1.1.2. Toxinas Cry.

Dentro de este grupo de proteínas, encontramos aquellas que son tóxicas a insectos del orden Lepidoptera, Diptera, Coleoptera e Hymenoptera, y algunos nematodos (Crickmore, *et al.*, 1998). La clasificación de las toxinas Cry, está dada con base en la secuencia primaria de aminoácidos, en donde las proteínas con menos del 45% de identidad son denotadas con un número arábigo (Ej. Cry1, Cry2, etc.). Si comparten menos del 78% pero más del 45% de identidad se le da la asignación con una letra mayúscula (Ej. Cry1A, Cry1B etc.), si comparten más del 78% pero menos del 95% de identidad se les asigna una letra minúscula (Ej. Cry1Aa, Cry1Ab, etc) y si comparten más del 95% de identidad se les vuelve a asignar nuevamente un número arábigo (Crickmore, *et al.*, 2012).

A la fecha se han obtenido, la estructura tridimensional de 10 diferentes toxinas Cry mediante cristalografía de rayos X (Li, *et al.*, 1991; Grochulski, *et al.*, 1995; Morse, *et al.*, 2001; Derbyshire, *et al.*, 2001; Galitsky, *et al.*, 2001; Li, *et al.*, 2001; Boonserm, *et al.*, 2005; Boonserm, *et al.*, 2006; Gou, *et al.*, 2009; Hui, *et al.*, 2012) mostrando que son proteínas globulares, con estructuras compuestas por tres dominios (Figura 2), que a pesar de poseer una baja identidad en la secuencia de aminoácidos presentan una alta similitud en la estructura, lo cual sugiere que éstas pudieran presentar un mecanismo de acción similar.

El Dominio I es un conjunto de siete α -hélices, la hélice α -5 es hidrofóbica y se encuentra rodeada por las otras seis α -hélices que son de carácter hidrofílico. Este dominio es el responsable de la inserción de la toxina en la membrana, de la oligomerización y de la formación del poro. El Dominio II está constituido por tres láminas β -plegadas antiparalelas, con asas expuestas en la parte apical, las

cuales se encuentran involucradas en la interacción con diferentes receptores, participando en la determinación de la especificidad de la toxina. El dominio III consta de dos laminas β -antiparalelas, las cuales forman una estructura en forma de un β -emparedado. Este dominio también está involucrado en la unión a receptores y en conferir especificidad a la toxina (Li, *et al.*, 1991; Chen, *et al.*, 1993; Grochulski, *et al.*, 1995; Wolfersberg, *et al.*, 1996; Schnepf, *et al.*, 1998; Galitsky, *et al.*, 2001; Morse, *et al.*, 2001; De Maagd, *et al.*, 2003; Boonserm, *et al.*, 2005, 2006; Pigott y Ellar, 2007).

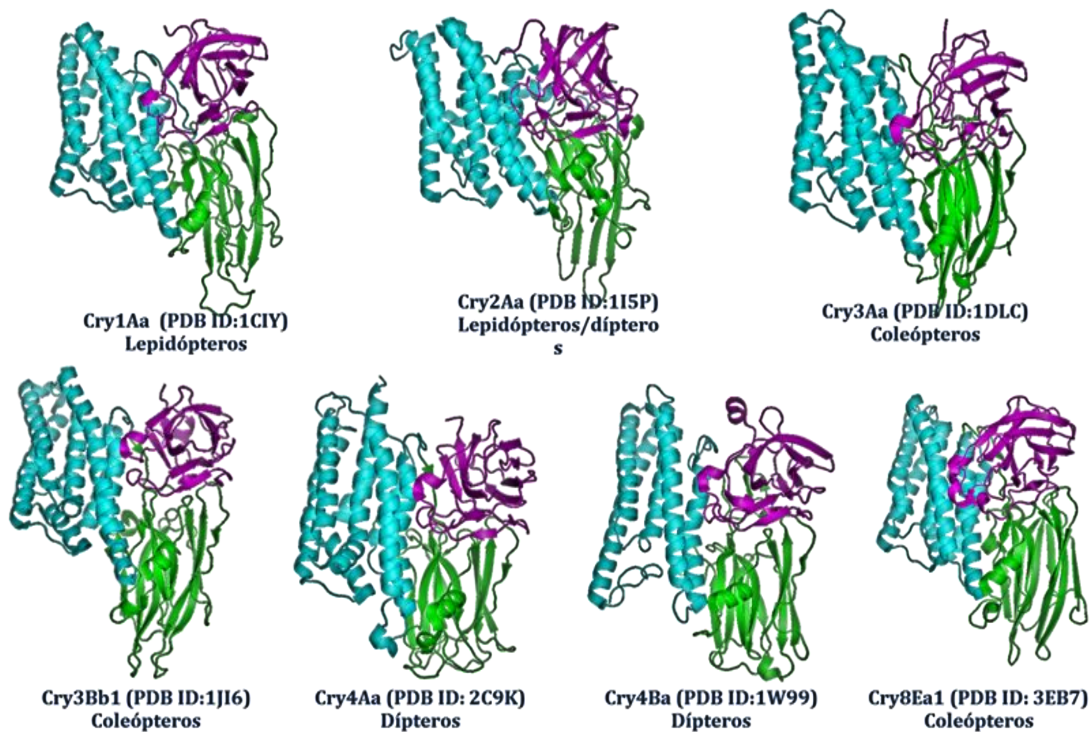


Figura 2. Estructura terciaria de las toxinas Cry1aA, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry4Ba, Cry3Bb1, Cry4Aa, Cry4Ba y Cry8Ea1. Los dominios I, II y III se encuentran mostrados en color azul, verde y morado respectivamente.

1.1.2.1. Mecanismo de acción de las toxinas Cry.

El mecanismo de acción de las toxinas Cry, es complejo e involucra varios pasos y ha sido caracterizado principalmente para las toxinas Cry1A en insectos lepidópteros. La acción primaria de estas toxinas es la lisis de las células epiteliales del intestino medio, ya que forman poros líticos en las microvellosidades apicales de estas células. Una vez que la larva ingiere los cristales, las protoxinas que conforman el cristal (Masa molecular= 130 kDa) son solubilizadas por el pH alcalino y el ambiente reductor del intestino (Gringorten, *et al.*, 1992) estas condiciones favorecen el rompimiento de los puentes disulfuro presentes en el extremo C-terminal (Knowles y Dow, 1993). Posteriormente, se lleva a cabo la activación proteolítica de estas protoxinas por medio de proteasas alcalinas (serin proteasas, tripsina, quimiotripsina) presentes en el intestino de la larva, dando como resultado la producción del monómero de la toxina activada (Masa molecular= 60 kDa), resistente a las proteasas (Höfman, *et al.*, 1988; De Maagd, *et al.*, 2001; Bravo, *et al.*, 2004).

Posterior a la activación, el monómero se une a receptores específicos localizados en las membranas de las microvellosidades apicales de las células epiteliales (Figura 3; Höfmann, *et al.*, 1988). En una primera instancia se une a los receptores anclados a la membrana a través del lípido glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) como son aminopeptidasa-N (APN) (Knight, *et al.*, 1994; Sangadala, *et al.*, 1994) y fosfatasa alcalina (ALP) (Jurat-Fuentes y Adang, 2004; Fernández, *et al.*, 2006; Arenas, *et al.*, 2010) por medio del asa 3 (Dominio II) y de la región β 16 (Dominio III) con afinidades de $K_d = 101.6$ y $K_d = 267.3$ nM respectivamente (Pacheco, *et al.*, 2009; Arenas, *et al.*, 2010). Posteriormente, la toxina se une al receptor cadherina (CDR) a través de las asas 2, 3 y α -8 (Dominio II) con una afinidad de $K_d = 1$ nM (Gómez, *et al.*, 2002 (a, b); 2003; 2006.). Esta unión provoca un corte proteolítico en la hélice α -1, promoviendo un cambio conformacional en la toxina que favorece la formación de un oligómero de 3 o 4 subunidades (Gómez, *et al.*, 2002). Se propone que este paso ocasiona que el complejo estructural

aumente su afinidad a los receptores APN ($K_d = 0.6 \text{ nM}$) y ALP ($K_d = 0.5 \text{ nM}$) por medio del asa 2 del dominio II (Arenas, *et al.*, 2010).

Una vez que el oligómero se ha unido a los receptores anclados a GPI, éste se inserta en la membrana y forma un poro (diámetro de uno a dos nanómetros), por el cual pueden pasar libremente iones K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{+2} , este hecho origina un desbalance osmótico y en consecuencia provoca la lisis celular, lo que conlleva finalmente a la muerte del insecto (Figura 4) (Schnepf, *et al.*, 1998; De Maagd, *et al.*, 2001; Bravo, *et al.*, 2004). Mutaciones en las asas que están involucradas en la unión a los receptores, resultan en proteínas que incrementan o disminuyen su toxicidad contra insectos específicos, lo cual correlaciona con un incremento o disminución en la unión a los receptores presentes en las microvellosidades apicales de las células epiteliales (BBM por sus siglas en inglés “Brush Border Membrane”) de estos insectos (Rajamohan, *et al.*, 1996).

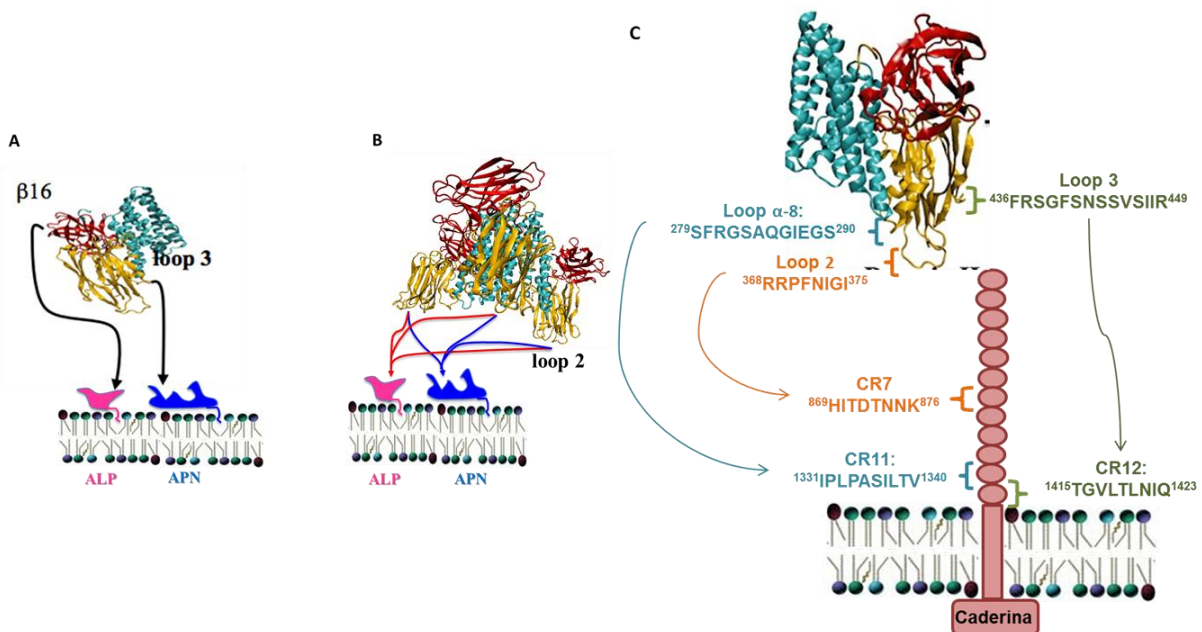


Figura 3. Sitios de interacción de la toxina Cry1Ab a los receptores ALP, APN y Cadherina (CDR): **(A)** Interacción del monómero de la toxina Cry1Ab a los receptores ALP (β-16) y APN (loop 3); **(B)** Interacción del oligómero de la toxina Cry1Ab a los receptores ALP y APN, la interacción se da a través del loop 2; **(C)** Interacción del monómero al receptor caderina, la interacción al repetido 12 de caderina (CR12) se da a través del loop 3, al repetido 7 (CR7) por el loop 2 y al repetido 11 (CR11) por el loop α-8.

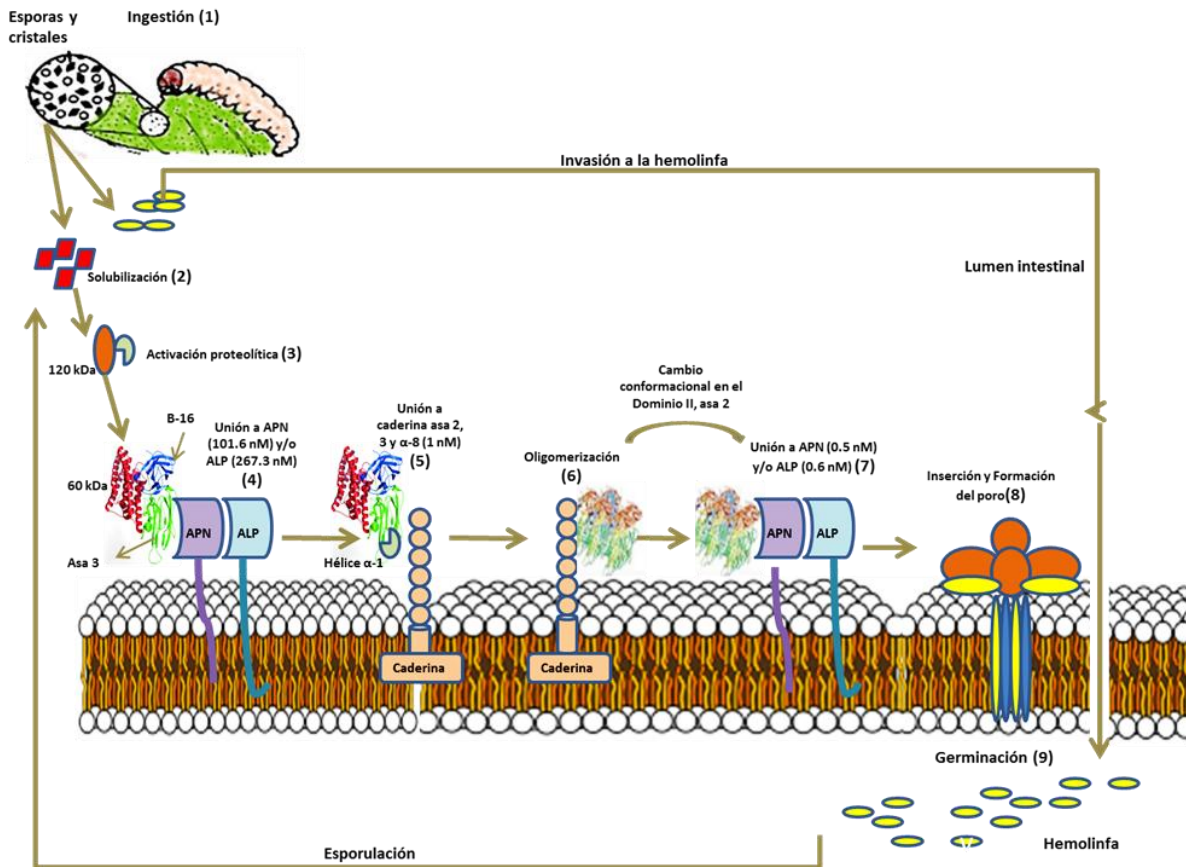


Figura 4. Modo de acción de las toxinas Cry: (1) Ingestión de las esporas y cristales; (2) Solubilización de los cristales liberando las protoxinas; (3) Activación proteolítica de la toxina, que da origen al monómero; (4) Unión a los receptores APN y ALP con afinidades de 101.6 nM y 267.3 nM respectivamente; (5) Unión a CDR con una afinidad de 1 nM, en este punto ocurre un corte proteolítico de la hélice α-1, lo que permite la exposición de regiones hidrofóbicas que permiten la formación del oligómero; (6) Oligomerización, en este paso el oligómero sufre un cambio conformacional; (7) El oligómero se une con alta afinidad a APN (0.5 nM) ó a ALP (0.6 nM); (8) Inserción y formación del poro, lo que ocasiona un desbalance osmótico; (9) Invasión de la hemolinfa, las esporas comienzan su germinación.

1.1.3. Toxinas Cyt

Las toxinas Cyt son tóxicas hacia insectos dípteros, no presentan ningún efecto en insectos lepidópteros ni coleópteros, con excepción del coleóptero *Crysomela scripta* en donde se ha reportado una baja toxicidad de la toxina Cyt1Aa (Federici y Bauer, 1998). Las toxinas Cyt reciben su nombre debido a que poseen actividad citolítica *in vitro* hacia diferentes líneas celulares provenientes de distintos tejidos de insectos, así como a eritrocitos (Thomas y Ellar, 1983a; Knowles, *et al.*, 1992). Estas toxinas (masa molecular 27 kDa) también son solubilizadas en el intestino de la larva y son sujetas a activación proteolítica de los extremos N- y C-terminal en el intestino de la larva, dando como resultado un fragmento de ~22 a 25 kDa resistente a proteasas (Al-yahyaee y Ellar, 1995). Hasta la fecha no se ha identificado un receptor proteínico para las toxinas Cyt en las membranas de las células del intestino larvario de los mosquitos. Se propone que estas proteínas interaccionan directamente con fosfolípidos insaturados como: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomiélin (Thomas y Ellar, 1983b). Es importante resaltar que estas toxinas son inocuas para otros insectos como lepidópteros, además presentan una actividad baja hacia mosquitos.

A la fecha se han obtenido, mediante cristalografía de rayos X, la estructura tridimensional de tres toxinas Cyt (Cyt2Ba, Cyt2Ab y Cyt1Aa) las cuales muestran una topología muy similar (Figura 5). La característica principal de estas estructuras es que se encuentran constituidas por un solo dominio estructural del tipo α - β , formado por un ramillete de siete hebras β (que se numeran del 1-7), rodeadas por dos capas de α -hélices anfipáticas (nombradas hélices A-B y C-D) con los residuos hidrofóbicos distribuidos hacia las hebras β y los residuos polares en la superficie de la molécula. La toxina Cyt1Aa presenta similitud estructural con otras toxinas como la volvatoxina, la toxina Evf y las toxinas Cyt de *Dickeya dadantii* las cuales afectan la membrana de diferentes blancos (Pandelakis, *et al.*, 1996; Cohen, *et al.*, 2008; Cohen, *et al.*, 2011).

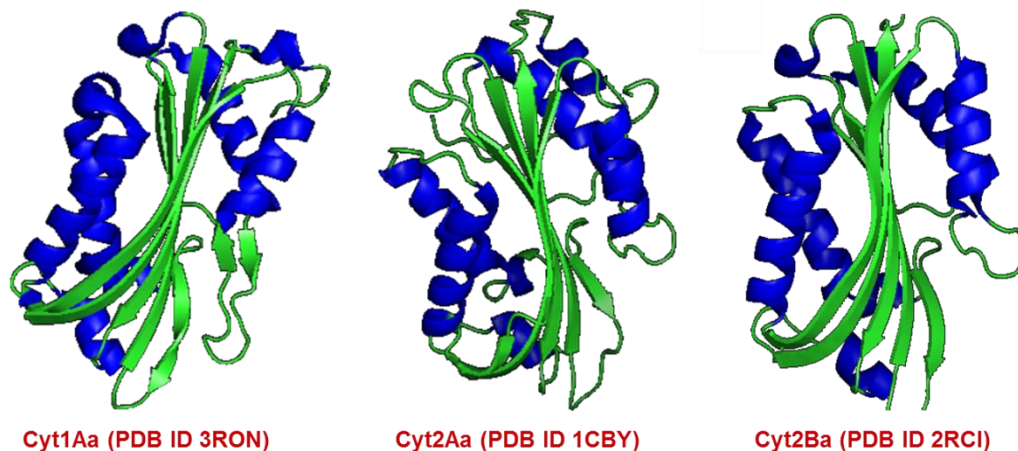


Figura 5. Estructura terciaria de las toxinas Cyt1Aa, Cyt2Aa y Cyt2Ba. Las toxinas están constituidas por un dominio estructural del tipo α - β , las siete hebras β se muestran en color verde y las dos capas de α -hélices en azul.

1.1.3.1. Mecanismo de acción de las toxinas Cyt.

Existen dos modelos para explicar la toxicidad de Cyt1A hacia las larvas de mosquitos. En el modelo de formación de poro se propone que las toxinas Cyt forman poros o canales en la membrana plasmática, ocasionando un desequilibrio osmótico y posteriormente la lisis celular. De acuerdo con esta hipótesis, las toxinas Cyt se unen irreversiblemente a la membrana celular en un arreglo oligomérico de varias subunidades, para formar un poro en células epiteliales en el intestino del mosquito (Pandelakis, *et al.*, 1996). Este modelo propone que las láminas β 5-7 son las que se insertan en las membranas formando un barril tipo β y las hélices α permanecen en la superficie (Knowles. *et al.*, 1989). El otro modelo propone que las toxinas Cyt se agregan de forma desestructurada sobre la superficie de la membrana, permitiendo un efecto tipo detergente, causando que la membrana se rompa en complejos de lípidos-proteínas tipo micela de diversos tamaños, provocando la lisis celular y la muerte del insecto blanco (Manceva, *et al.*, 2005). En realidad los dos modelos no son excluyentes y dependen de la concentración de la toxina (Figura 6).

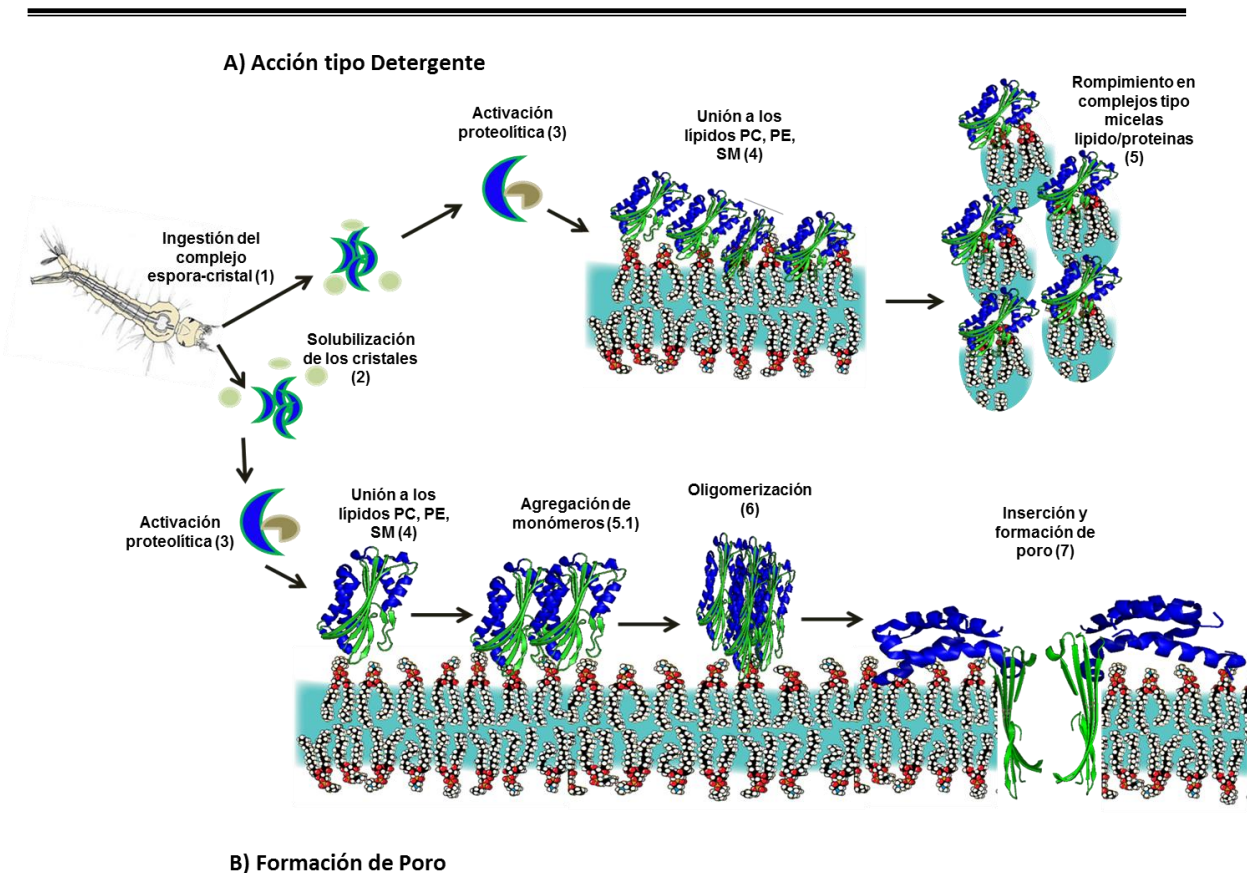


Figura 6. Modo de acción de las toxinas Cyt. **(A)** Modelo acción tipo detergente, **(B)** Modelo formación de poro. (1) Ingestión de las esporas y cristales; (2) Solubilización de los cristales liberando las protoxinas; (3) Activación proteolítica de la toxina, que da origen al monómero; (4) Unión a los lípidos de membrana fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y esfingomiélin (SM); (5) Rompimiento en complejos tipo micelas lípido/proteína; (5.1) Agregación de monómeros; (6) Oligomerización, en este paso el oligómero sufre un cambio conformacional; (7) Inserción y formación del poro, lo que ocasiona un desbalance osmótico.

Como se mencionó anteriormente una de las características más importantes de las toxinas Cyt es su capacidad de potenciar la actividad de las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa activas contra mosquitos. De manera individual cada una de estas toxinas presentan baja actividad insecticida, sin embargo, su toxicidad se potencia al emplearse de manera conjunta. Los sitios de interacción entre estas toxinas han sido identificados. Estas dos toxinas interaccionan con alta afinidad ($K_d = 0.4 \text{ nM}$). Los sitios de interacción involucran a las hebras β -6, β -7 y la α -hélice 5 de Cyt1Aa y las asas α -8, 2 y la hebra β -4 del dominio II de Cry11Aa. Interesantemente el asa α -8 de Cry11Aa también está involucrada en la

interacción con su receptor fosfatasa alcalina. La mutagénesis sitio dirigida de estas regiones afectaron la interacción entre estas proteínas y también el sinergismo (Pérez, *et al.*, 2005). Esto sugiere que la interacción entre Cyt1Aa y Cry11Aa o Cry4Ba es fundamental para inducir el sinergismo entre estas toxinas, por lo que se propuso que Cyt1Aa funciona como un receptor para estas toxinas Cry. Posteriormente se demostró que esta interacción induce la oligomerización de Cry11Aa (Pérez, *et al.*, 2007; Cantón, *et al.*, 2010), semejante al receptor CDR que induce la oligomerización de las toxinas Cry1A en lepidópteros (Pardo-López, *et al.*, 2013).

2. ANTECEDENTES.

Las δ -endotoxinas de Bt han sido modificadas genéticamente en varias ocasiones con la finalidad de alterar o inducir el reconocimiento a los distintos receptores, ampliar el rango de hospederos, potenciar la interacción de estas toxinas con las membranas e inducir la habilidad para formar poros (Honée, *et al.*, 1990, 1991; Bosch, *et al.*, 1994; Rajamohan, *et al.*, 1996; Chandra, *et al.*, 1999; Singh, *et al.*, 2004). Se ha demostrado que el intercambio de los dominios II y III entre las proteínas Cry puede dar como resultado toxinas mejoradas en términos de toxicidad o insecto blanco (de Maagd, *et al.*, 2001). De manera similar, la combinación adecuada de los dominios II y III puede optimizar los pasos de unión a receptores y aumentar la toxicidad, quizás esto se debe al hecho de que el dominio II y el dominio III confieren diferentes interacciones que le permiten unirse a los receptores CDR, APN y ALP en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio (de Maagd, *et al.*, 2000; Naimov, *et al.*, 2001; Karlova, *et al.*, 2005; Gómez, *et al.*, 2007). Por otro lado, la modificación de los residuos que conforman las distintas asas de los dominios II y III de las toxinas Cry, también han generado toxinas que han incrementado su toxicidad o han migrado su actividad a otros insectos no blanco (Liu y Dean, 2006; Shao, *et al.*, 2016). Cabe mencionar que lo anterior se ha llevado a cabo principalmente en el

grupo de las toxinas de tres dominios (Cry) y no así con tanto énfasis para las toxinas Cyt.

2.1. Ingeniería de las toxinas Cry.

Mutagénesis sitio dirigida en las asas de las toxinas Cry, es una de las estrategias que se ha utilizado para mejorar la acción tóxica de estas toxinas en distintos grupos de insectos, por ejemplo, Rajamohan y colaboradores (1996), llevaron a cabo sustituciones y deleciones de los aminoácidos que conforman el asa 2 del dominio II de Cry1Ab, con la finalidad de determinar el papel de esta asa en la unión a los receptores de *Lymantria dispar* (Lepidóptero). Observaron que la sustitución del residuo N372 por Ala o Gly (N372A, N372G) resultó en la generación de una toxina que incrementó entre ocho y 36 veces la toxicidad en larvas neonatas de *L. dispar*. Además, se potenció aproximadamente cuatro veces la unión de esta toxina a las BBM del intestino de este lepidóptero.

En otro trabajo se modificaron los residuos de las asas del dominio II de la toxina Cry3Aa, generando dos grupos de mutantes A1 (R345A, Y350F, Y351F) y A2 (R345A, Δ Y350, Δ Y351), las cuales incrementaron diez veces la toxicidad en los coleópteros *Tenebrio molitor*, *Leptinotarsa decemlineata* y *Chrysomela scripta*. Además, observaron que estas mutantes incrementaron 2.5 veces la unión a las BBM en comparación con la toxina Cry3Aa nativa (Wu, *et al.*, 2000). Por otro lado, Shao y colaboradores (2016) reemplazaron las asas del dominio II de Cry1Ab por pequeños péptidos que unen a las BBM de las ninfas de *Nilaparvata lugens* (Hemíptero), con el objetivo de inducir la toxicidad de Cry1Ab en este grupo de insectos. Observaron que las toxinas Cry1Ab híbridas incrementaron la toxicidad aproximadamente nueve veces en las ninfas de este insecto.

Además, el intercambio de dominios entre toxinas Cry ha resultado ser una herramienta efectiva para incrementar la toxicidad y cambiar la especificidad en diferentes insectos, por ejemplo, Naimov y colaboradores (2001), combinaron el

dominio I y II de Cry1Ia con el dominio III de Cry1Ba, dando como resultado una toxina híbrida Cry1Ia-1Ba que incrementó 7.5 veces la toxicidad en *L. decemlineata* (Coleóptero) comparada con la Cry1Ba nativa. Por otro lado, de Maagd y colaboradores (2000), realizaron la combinación del dominio I y II de Cry1Ba con el dominio III de Cry1Ca, generando una toxina que mostró un incremento de 40 veces la toxicidad hacia *Spodoptera exigua* y *Manduca sexta*, comparado con la Cry1Ba nativa. Resultados similares se obtuvieron cuando se realizó la combinación del dominio III de Cry1C con el dominio III de Cry1A y/o Cry4 (Sakai, *et al.*, 2007; Karlova, *et al.*, 2005); o el intercambio del dominio I y II de Cry1Ab con el dominio III de Cry1C (de Maagd, *et al.*, 1996).

Sun y colaboradores (2014), realizaron la combinación de los distintos dominios de las toxinas Cry11Aa y Cry11Ba, generando 6 quimeras, de las cuales sólo una presentó un incremento de la toxicidad en larvas de *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*. Por otro lado, Shan y colaboradores (2017) combinaron los dominios II y III de Cry9Aa con el dominio I de Cry1Ac, la toxina híbrida generada de esta combinación presentó un incremento de cuatro veces la toxicidad en larvas de *Helicoverpa armigera*.

En los últimos años también se han implementado otras estrategias para mejorar la toxicidad de las toxinas Cry, como son la fusión de toxinas o la inserción de otras proteínas no relacionadas con Bt. Por ejemplo, Sellami y colaboradores (2018) llevaron a cabo la fusión de la toxina Vip3A con la toxina Cry1Ac; la toxina híbrida de aproximadamente 150 kDa generada por este grupo, fue capaz de potenciar en un 20% la toxicidad contra *Ephestia kuehniella* en comparación con las toxinas Vip3A y Cry1Ac evaluadas de manera individual. De manera similar, la fusión de la toxina Cry1Ac a una quitinasa, dio como resultado una toxina híbrida con un incremento de 11.30 veces en la toxicidad contra *Helicoverpa armigera* (Ding *et al.*, 2008). La inserción de la captosina G en el sitio de corte de la tripsina dentro la toxina Cry3Aa, mejoró la activación proteolítica de esta toxina e

incrementó la unión a los receptores intestinales de *Diabrotica virgifera* (Walter, *et al.*, 2008).

Otra estrategia que se ha implementado para mejorar la actividad de las toxinas Cry, es la delección de fragmentos de la región N-terminal. En este sentido, Soberón y colaboradores (2007) llevaron a cabo la delección de aminoácidos en la región N-terminal de las toxinas Cry1A incluyendo la región correspondiente a la hélice α -1 (llamadas toxinas Cry1AMod). Estas toxinas Cry1AMod son capaces de oligomerizar en ausencia del receptor CDR y son capaces de matar a insectos que han generado resistencia a las toxinas Cry1A debido a mutaciones en este receptor. Por otro lado, la eliminación de 42 residuos de aminoácidos en la región amino-terminal de la toxina Cry2Aa generó que esta aumentara tres veces su toxicidad contra larvas de *S. littoralis* y *Agrotis ipsilon* (Mandal, *et al.*, 2007; Morse, *et al.*, 2001).

Se ha observado que algunas toxinas híbridas resultan en una disminución en la toxicidad (Karlova, *et al.*, 2005; Rang, *et al.*, 2001). Además, las toxinas Cry que son específicas contra lepidópteros (Cry1, Cry2 y Cry9) presentan diferentes niveles de actividad insecticida hacia insectos plaga específicos. Por ejemplo, la toxina Cry1Ac exhibe una elevada toxicidad para *H. armigera* (Li y Bouwer 2012, Chandrashekar, *et al.*, 2005, Liao, *et al.*, 2002), mientras que la toxina Cry9Aa muestra una toxicidad más baja para esta especie (Li y Bouwer 2012, Liao y otros 2002; Chakrabarti *et al.* 1998). Dado lo anterior, es importante que se tenga pleno conocimiento de cuáles son las regiones importantes para la especificidad dentro de cada toxina, para poder generar nuevas variantes de toxinas que permitan controlar con alta efectividad a las diferentes especies de insectos.

2.2. Ingeniería de las toxinas Cyt.

Existen muy pocos trabajos en los que se ha realizado ingeniería de las toxinas Cyt con la finalidad de potenciar o ampliar su rango de acción; sin embargo, las características de este grupo de toxinas las hace un blanco atractivo para generar nuevas proteínas que potencien su acción tóxica en insectos transmisores de enfermedades (moscos) y/o que puedan ser aplicadas en cultivos en donde ciertos grupos de insectos ya han generado resistencia a las toxinas Cry de Bt.

Por ejemplo, Bideshi y colaboradores (2017), llevaron a cabo la fusión de la toxina Cyt1Aa de Bt subsp. *israelensis* con la toxina BinA de *Lysinibacillus sphaericus*, (Cyt1Aa-BinA 69.6 kDa) con la finalidad de potenciar la unión de esta toxina en las BBM de cuatro especies de mosquitos (*Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*). Observaron que la toxina Cyt1Aa-BinA híbrida resultó ser tóxica para las cuatro especies de mosquitos (Tabla 2), incrementando su toxicidad entre 55 y 116 veces comparado con la toxicidad evaluada de manera individual.

Tabla 2. Toxicidad de la toxina Cyt1Aa-BinA híbrida en larvas de 4to instar de *Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*.

Especie de Mosco	CL ₅₀ ng/ml (Cyt1Aa-BinA)	CL ₅₀ ng/ml (BinA)	CL ₅₀ ng/ml (Cyt1Aa)
<i>Anopheles gambiae</i>	23.0 (17.6–30.0)	201.2 (154.6–260.4)	46,557.3 (13,980.9–137,613.6)
<i>Anopheles stephensi</i>	28.9 (22.0–37.2)	707.5 (620.3–808.5)	7,779.5 (6,758.9–9,028.8)
<i>Aedes aegypti</i>	61.9 (46.7–80.1)	>1,000,000	4,218.7 (2,997.1–5,709.8)
<i>Culex quinquefasciatus</i>	9.2 (7.2–12.1)	181.4 (118.1–296.3)	47,370.1 (35,629.5–59,705.4)
<i>Culex quinquefasciatus</i> BS-Rb (Resistente)	10.2 (2.6–41.4)	>1,000,000	27,022.4 (20,523.2–35,262.4)

En otro trabajo, Chougule y colaboradores (2013) identificaron un péptido denominado GBP3.1, el cual une a una aminopeptidasa-N presente en las BBM de *Acyrtosiphon pisum* (hemíptero de gran importancia agrícola y que no es susceptible a las toxinas Cyt de *Bt*). Con base en lo anterior, decidieron introducir la secuencia de este péptido (TCSKKYPRSPCM) en la toxina Cyt2Aa de *Bt* con la finalidad de potenciar la unión de esta toxina en las BBM y de esta manera incrementar la toxicidad de Cyt2Aa en *A. pisum* y *Myzus persicae*. Los autores identificaron seis sitios potenciales en la estructura de la toxina Cyt2Aa para la inserción del péptido GBP3.1 (Figura 7) y plantearon hacer la construcción de dos grupos de toxinas Cyt2Aa híbridas que contuvieran a este péptido. Uno de los grupos consistió en la construcción de toxinas híbridas las cuales tuvieran la inserción del péptido GBP3.1 en los sitios seleccionados (CGALn). El segundo grupo consistió en hacer sustituciones de aminoácidos en las seis asas y remplazarlos por GBP3.1 (CGSLn; Figura 7). Cabe mencionar que el asa 6 no fue seleccionada para estas construcciones debido a que es una región conservada entre toxinas Cyt, lo que sugiere que tiene una función importante además de ser el sitio de unión con la toxina Cry11Aa que determina el sinergismo entre Cyt y Cry.

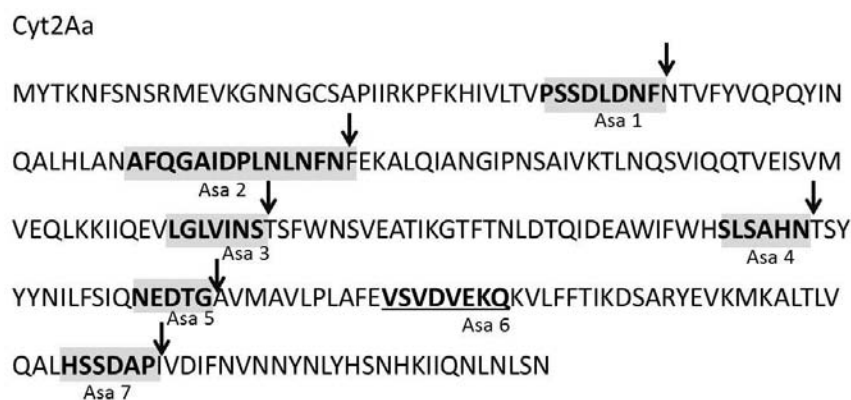


Figura 7. Sitios de inserción del péptido GBP3.1 en la secuencia de Cyt2Aa. Los aminoácidos resaltados en gris fueron sustituidos con GBP3.1 y las flechas indican los sitios de inserción de GBP3.1.

Cuando analizaron la activación de las doce toxinas Cyt2Aa híbridas con tripsina, observaron que solo nueve (CGAL1, CGAL3, CGAL4, CGAL6; CGSL1, CGSL2, CGSL4, CGSL5, CGSL6) de las doce fueron estables a la activación proteolítica. La unión de la toxinas híbridas al intestino la analizaron a través de ensayos tipo “pull-down” y el aumento en la actividad de unión lo cuantificaron a través de experimentos de “Surface plasmon resonance” (SPR). Los resultados que obtuvieron indican que solo cinco (CGAL1, CGAL3, CGAL4, CGSL1 y CGSL4) de las nueve construcciones mostraron un aumento en la unión a las BBM apicales del intestino en *A. pisum* y *M. persicae* comparado con la toxina nativa, además cuando se realizaron los bioensayos de toxicidad observaron que las cinco toxinas híbridas que mostraron unión a BBM del áfido mostraron toxicidad significativa hacia *A. pisum* y *M. persicae* y siguen siendo tóxicas contra el mosquito *A. aegypti* (Tabla 3).

Tabla 3. Mortalidad en *M. persicae*, *A. pisum* y *A. aegypti* ocasionada por las cinco toxinas híbridas.

Toxin	LC ₅₀ ± SE, µg/mL (CL 95%)						
	Mosquito larvicidal activity			Aphicidal activity			
	<i>Ae. aegypti</i>		Relative LC ₅₀	<i>A. pisum</i>		<i>M. persicae</i>	
Cyt2Aa	0.37 ± 0.07	(0.21–0.90)	1	>>150 ± 0.00	(NA)	>>150 ± 0.00	(NA)
CGAL1	0.22 ± 0.04	(0.06–0.43)	0.58	19.71 ^b ± 5.74	(2.51–21.00)	58.04 ± 2.08	(35.01–65.73)
CGAL3	0.62 ± 0.04	(0.24–1.30)	1.68	9.55 ^a ± 2.54	(0.65–12.23)	42.68 ± 0.49	(17.18–83.04)
CGAL4	0.18 ± 0.05	(0.01–0.82)	0.49	11.92 ^a ± 1.99	(0.83–22.43)	92.75 ± 2.54	(34.67–152.96)
CGSL1	0.36 ± 0.06	(0.19–0.79)	0.97	28.74 ^b ± 2.92	(6.40–93.40)	ND	
CGSL4	0.40 ± 0.05	(0.12–0.91)	1.09	15.13 ^a ± 0.23	(4.3–25.60)	ND	

Diferencias estadísticas están denotadas por letras diferentes. ND no determinada. Tabla tomada de Chougule *et al.*, 2013.

Los resultados obtenidos en los trabajos mencionados anteriormente, nos permiten predecir que es posible realizar ingeniería de las toxinas Cyt para migrar su toxicidad hacia otro grupo de insectos.

3. JUSTIFICACIÓN.

La toxina Cyt1Aa además de potenciar la actividad de las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba, es capaz de revertir la resistencia que algunos mosquitos han generado hacia estas toxinas Cry. En estudios de laboratorio se han seleccionado poblaciones de *C. quinquefasciatus* resistentes a Cry4Aa, Cry4Ba y Cry11Aa, así como a la mezcla de estas toxinas. Sin embargo, esta resistencia se revierte cuando las poblaciones de mosquitos son tratadas con esas toxinas Cry en presencia de Cyt1Aa (Wirth, *et al.*, 1997). Por otra parte, también se ha reportado que no ha sido posible aislar mosquitos resistentes a la toxina Cyt1Aa en campo ni en condiciones de laboratorio. Es importante mencionar que la toxina Cyt1Aa no es tóxica para insectos lepidópteros ni tampoco es capaz de potenciar la actividad de otras toxinas Cry activas contra otros órdenes de insectos como las toxinas Cry1A (activas hacia lepidópteros). Por lo que, la construcción de toxinas Cyt1Aa híbridas que lleven las regiones de interacción de Cry1Ab a sus receptores presentes en células de insectos lepidópteros, como por ejemplo el asa 3 (FRSGFSNSSVSI) o el asa 2 (SSTLYRRPFNI) de Cry1Ab (que participan en la unión CDR, APN y ALP) permitirá obtener proteínas Cyt1Aa que sean capaces de anclarse a estos receptores e inducir toxicidad hacia lepidópteros. De igual forma se podría especular que estas toxinas híbridas podrían inducir toxicidad de Cry11Aa en insectos lepidópteros. De esta manera se podría contar con toxinas híbridas que puedan tener un rango de acción más amplio, es decir, que puedan ser tóxicas a otros órdenes de insectos como los lepidópteros y quizás potenciar la actividad de otras toxinas Cry. El asa 3 es importante para la unión de Cry1Ab con CDR, ALP y APN como monómero y el asa 2 es importante en la interacción con CDR como monómero y con ALP y APN como oligómero (Gómez *et al.*, 2003 y 2006; Arenas *et al.*, 2010; Pacheco *et al.*, 2010).

4. HIPOTESIS

Toxinas Cyt1Aa que contengan la inserción del asa 2 o 3 de la toxina Cry1Ab serán capaces de unirse a los receptores de Cry1Ab y ser tóxicas a lepidópteros como *M. sexta*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General.

- Construir variantes de la toxina Cyt1Aa que unan a los receptores de Cry1Ab en lepidópteros para migrar su toxicidad hacia este grupo de insectos.

5.2. Metas particulares.

- Construir variantes de la toxina Cyt1Aa que contengan la inserción del asa 2 o 3 de la toxina Cry1Ab en diferentes localizaciones.
- Evaluar la unión de las variantes de la toxina Cyt1Aa que contengan la inserción del asa 2 o 3 de la toxina Cry1Ab a los receptores APN, ALP y CDR de *M. sexta*.
- Analizar la actividad tóxica de las variantes de la toxina Cyt1Aa que contengan la inserción del asa 2 o 3 de la toxina Cry1Ab en larvas de *M. sexta*, *P. xylostella* y *A. aegypti*.
- Analizar la capacidad de las variantes de la toxina Cyt1Aa que contengan la inserción del asa 2 o 3 de la toxina Cry1Ab de potenciar la actividad insecticida de Cry11Aa en larvas de *A. aegypti*.
- Analizar la actividad hemolítica de las variantes de la toxina Cyt1Aa que contengan la inserción del asa 2 o 3 de la toxina Cry1Ab en eritrocitos de conejo.

6. MATERIALES Y METODOS.

6.1. Cepas bacterianas.

Descripción de las cepas bacterianas que se utilizaron para generar las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción de las asas 3 y 2 de Cry1Ab.

Escherichia coli DH5 α : F⁻endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK-mK+), λ -. Se transforma con alta eficiencia. La mutación en A1 inactiva una endonucleasa intracelular que degrada ADN de plásmidos. La mutación en hsdR17 elimina la endonucleasa de restricción del sistema de modificación de restricción EcoKI, por lo que el ADN no se degrada. El marcador ϕ 80dlacZ Δ M15 proporciona una complementación del gen α de la β -galactosidasa del vector pUC o vectores similares, permitiendo la selección de colonias azules y/o blancas en placas bacterianas que contienen Bluo-gal o X-gal. recA elimina la recombinación homóloga, reduciendo la delección y multimerización del plásmido. glnV44 es el nombre sistemático de SupE44, un supresor ámbar.

Las células se crecieron en medio de cultivo líquido YENB hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.5-0.9 e inmediatamente se incubaron a 4°C por 5 min. Posteriormente las células se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min a 4°C, descartando el sobrenadante. La pastilla que se obtuvo del proceso de centrifugación se resuspendió suavemente en agua fría estéril adicionada con glicerol al 10% y se centrifugaron como en el paso anterior, este procedimiento se repitió dos veces. Finalmente las células se resuspendieron en 1 ml de Glicerol al 10%, se realizaron alícuotas de 50 μ l y se almacenaron a -70°C para su posterior uso.

Escherichia coli SCS110 (Stratagen): rpsL (Strr) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ (lac-proAB) [F' traD36 proABlacIqZ Δ M15]. La mayoría de las células de *E. coli* contienen genes de metilación de adenina (dam)

y citosina (dcm), estos genes codifican proteínas que metilan secuencias de ADN específicas cuando este se replica, haciendo imposible la digestión posterior con enzimas de restricción sensibles a la metilación. Las metilasas Dam reconocen secuencias GATC y metilan el residuo de adenina en la posición N-6, mientras que las metilasas Dcm reconocen la secuencia CCAGG y CCTGG y metilan la citosina interna en la posición C-5. La cepa SCS110 carece de las metilasas Dam y Dcm que se encuentran en la mayoría de las cepas de *E. coli*. El ADN en estas cepas puede ser digerido por enzimas sensibles a la metilación. Esta cepa contiene el gen *aclqZΔM15* en el epitoma F', permitiendo la selección entre colonias blancas y azules.

Las células se crecieron en medio de cultivo líquido LB hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.5-0.6 e inmediatamente se incubaron a 4°C por 5 min. Posteriormente las células se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min a 4°C, descartando el sobrenadante. La pastilla que se obtuvo del proceso de centrifugación se resuspendió suavemente en una solución de CaCl₂ 60 mM y Glicerol al 10% y se incubaron durante 30 minutos en hielo, posteriormente se centrifugaron como en el paso anterior y la pastilla se resuspendió en 1 ml de la solución de CaCl₂ 60 mM y Glicerol al 10%, se realizaron alícuotas de 50 µl y se almacenaron a -70°C para su posterior uso.

Bacillus thuringiensis 407⁻ Bt Cepa acristalifera que carece de capacidad para sintetizar toxinas Cry o Cyt debido a la pérdida de los plásmidos que codifican para estas toxinas.

Las células se crecieron en medio de cultivo líquido BHIG hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.5-0.6 e inmediatamente se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min a 4°C, descartando el sobrenadante. La pastilla que se obtuvo del proceso de centrifugación se resuspendió suavemente en una solución EB (Sacarosa 0.625 M, MgCl₂ 1 mM) y se centrifugaron como en el paso anterior. La pastilla se resuspendió en 1 ml de la solución EB y se utilizaron el mismo día.

6.2. Medios de Cultivo.

Descripción de los medios de cultivo que se emplearon para el crecimiento de las cepas bacterianas que se utilizaron para generar las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción de las asas 3 y 2 de Cry1Ab.

Medio LB: Peptona 10 g/L, Extracto de levadura 10 g/L, NaCl 5 g/L. (Sólido: adicionar 15 g/L de agar).

Medio SOC: Triptona 20 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, NaCl 0.5 g/L, KCl 0.186 g/L, MgCl₂ 0.095 g/L, Glucosa 0.5% v/v.

Medio HCT: Bactotripton 5 g/L, Casaminoácidos 2 g/L, se ajusta el pH a 7.25 con KOH. Después de esterilizar adicionar 50 ml de Solución I (68 g/L KH₂PO₄), 1 ml de Solución II (12.3 g/L MgSO₄ · 7H₂O; 0.169 g/L MnSO₄ · H₂O; 1.4 g/L ZnSO₄ · 7H₂O), 10 ml de Solución III (2 g/L Fe(SO₄) · 7H₂O; 100 ml de H₂SO₄ 1N), 10 ml de Solución IV (73.5 g/L CaCl₂ · 2H₂O) y 30 ml de Glucosa al 10%. Las soluciones se encuentran previamente esterilizadas en autoclave.

Medio BHIG: 23 g/L de infusión cerebro-corazón (Brain Heart Infusion Broth), Adicionar glicerol al 0.1% después de esterilizar.

Medio YENB: 7.5 g/L de extracto de levadura, 8 g/L de Caldo nutritivo.

6.3. Selección de los sitios que se utilizaron para generar las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab.

Con base en la estructura de la toxina Cyt1Aa se identificaron doce asas como sitios potenciales para llevar a cabo la inserción del asa 3 (FRSGFSNSSVSI) de Cry1Ab. Sin embargo, solo se consideraron 10 dado que la región del asa 11 y 12 está involucrada en la interacción con las toxinas Cry11 y Cry4 para potenciar su actividad insecticida. La inserción del asa 2 (YRRPFNIGINNQ) de Cry1Ab solo se llevó a cabo en las asas 6, 7 y 9 de la toxina Cyt1Aa, estos sitios se seleccionaron debido a que, las variantes con la inserción del asa 3 de Cry1Ab en las asas 6, 7 y 9 de la toxina Cyt1Aa aumentaron de manera significativa (ANOVA; $P < 0.001$) la toxicidad en larvas de *M. sexta* y *P. xylostela*, lo cual correlaciona con el incremento en la unión de estas tres variantes a los receptores APN, ALP y CDR, de *M. sexta*. En la figura 8A se muestran resaltados en rojo los sitios que se seleccionaron para la inserción del asa 3 de Cry1Ab [CytA3-Asa(n)] y los sitios marcados con un círculo rosa son los que se seleccionaron para la inserción del asa 2 de Cry1Ab [CytA2-Asa(n)] en la toxina Cyt1Aa; cada fragmento constituye un asa distinta y las flechas indican la posición en donde se llevó a cabo la inserción. En la figura 8B se muestra la estructura tridimensional de la toxina Cyt1Aa (PDB 3RON), en donde se puede observar que los sitios seleccionados para la inserción de las asas 2 o 3 de Cry1Ab se encuentran expuestos al solvente.

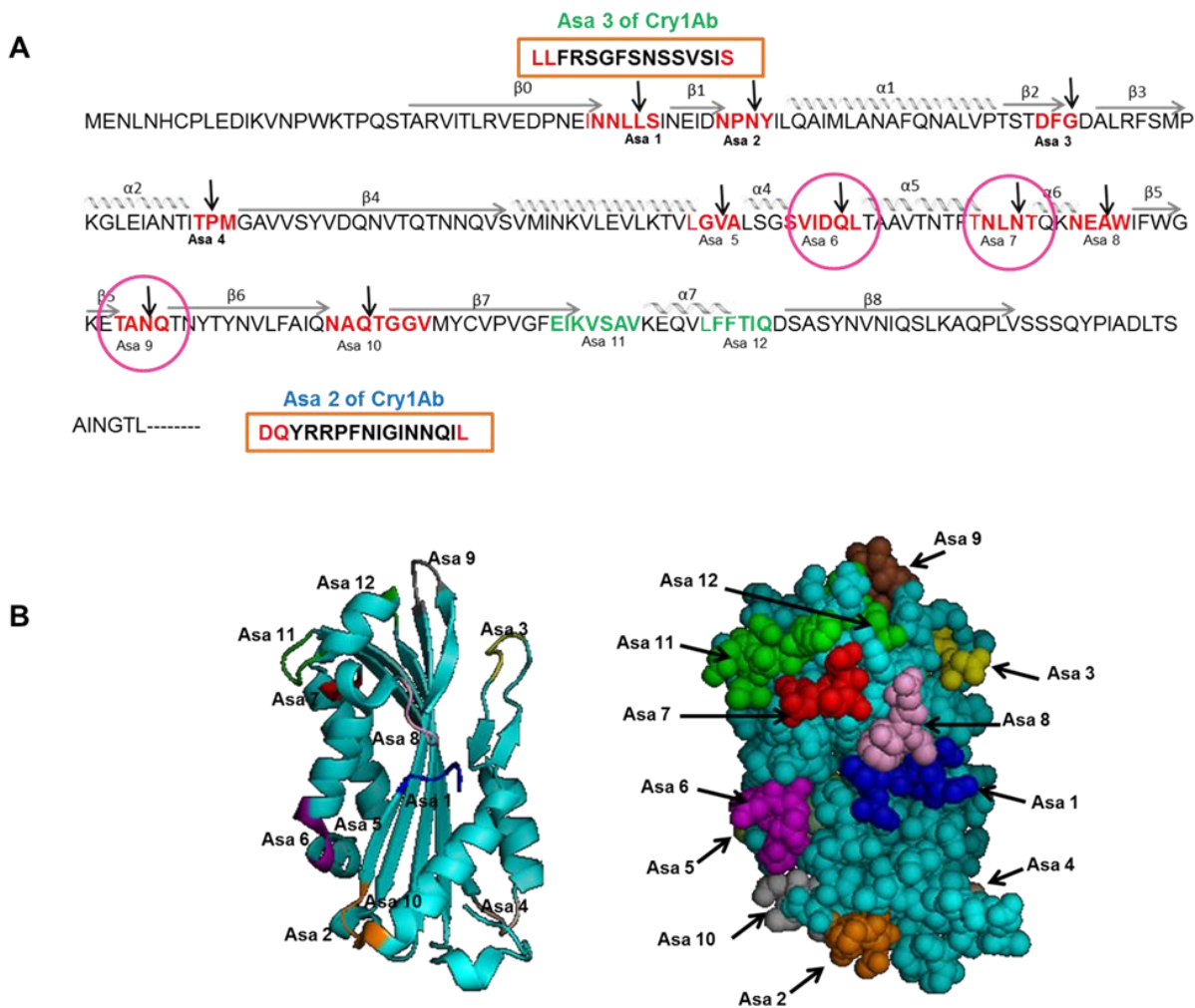


Figura 8. A) Secuencia peptídica de la toxina Cyt1Aa con los sitios de inserción para el asa 3 y asa 2 de Cry1Ab. Las flechas horizontales indican las hojas-β y los espirales las hélices-α. Los aminoácidos resaltados en rojo y negritas en la secuencia de Cyt1Aa son los sitios seleccionados en donde se llevó a cabo la inserción del asa 3 (FRSGFSNSSVSI) de Cry1Ab. Los Aminoácidos marcados con un círculo rosa en la secuencia de Cyt1Aa son los sitios seleccionados en donde se llevó a cabo la inserción del asa 2 (YRRPFNIGINNQ). Los aminoácidos resaltados en verde están involucrados en la interacción con la toxina Cry11 y Cry4. **B)** Estructura tridimensional de la toxina Cyt1Aa (PDB 3RON), mostrando que los sitios seleccionados se encuentran expuestos al solvente.

6.4. Construcción de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab.

La construcción de las toxinas Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab se llevó a cabo por PCR de empalme, para ello se utilizó como templado el plásmido PWF45 (el cual contiene el gen de la toxina Cyt1Aa; Wu, *et al.*, 1994) y se utilizaron oligos específicos para cada una de las asas de la toxina Cyt1Aa (Tabla 4 y Tabla 5). Estos oligonucleótidos fueron diseñados con ayuda del programa oligo 7. En la primera fase se realizó una PCR para incorporar la inserción del asa 2 o 3, ver oligos para PCR1 y PCR2 (Tabla 4 y Tabla 5), la amplificación de cada una de las reacciones (PCR1 y PCR2) se realizó de manera independiente con la enzima de alta fidelidad Vent DNA polymerase (NEB, Ipswich, MA) y el programa de PCR utilizado para la amplificación de estos fragmentos fue de: 3 min a 95°C, 35 ciclos (30 seg a 95°C; 30 seg a 55°C; 30 seg a 72°C) y 3 min a 72°C. El producto de esta PCR dio como resultado la amplificación de un fragmento de aproximadamente 200 pares de bases (pb).

Después de la amplificación, estos productos de PCR (~ 200 pb) se purificaron con el Kit Qiagen (Qiagen, Hilden, Germany) y se utilizaron los oligos externos con ambos productos de PCR como templados, esto permitió su empalme y la amplificación de un fragmento de aproximadamente 400 pb el cual contiene la región de interés amplificada (Figura 9; la enzima y el programa de PCR utilizados para el empalme de los fragmentos de ~ 200 pb, es el mismo que se menciona anteriormente). El mega primer de ~ 400 pb se utilizó para amplificar el plásmido completo PWF45 con la enzima de alta fidelidad Phusion™ High Fidelity DNA polymerase (NEB), el programa de PCR utilizado para la amplificación del plásmido fue de: 30 seg a 98°C, 35 ciclos (15 seg a 98°C; 1 min a 55°C; 7.5 min a 72°C) y 7 min a 72°C. Esta reacción de PCR permitió generar un nuevo plásmido de doble cadena con la inserción deseada y para eliminar el ADN parental, el producto de la reacción de PCR se trató con la enzima DpnI (NEB) durante 2 h a 37°C (endonucleasa específica que corta DNA metilado y hemimetilado), el

producto de esta reacción se purificó con el Kit Qiagen (Qiagen, Hilden, Germany) y se electroporó en células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α .

Transformación en células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α .

Para la electroporación se agregaron 10 μ l de ADN a 100 μ l de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α y se incubaron por 5 min a 4°C. Las células se transfirieron a una celda de 0.2 cm (BioRad) pre-enfriadas y se les aplicó un pulso de 2.5 V a 25 μ F y 400 Ω de resistencia. Posteriormente las células se colocaron en 1 ml de medio SOC y se incubaron 1 h a 37°C en agitación, transcurrido el tiempo se tomaron 200 μ l de células y se sembraron en cajas de LB-ampicilina (100 μ g/ml) y se incubaron 12 h a 37°C. Para verificar las construcciones se tomaron colonias aisladas y se crecieron en 5 ml de medio LB-ampicilina (100 μ g/ml) durante 12 h a 37°C. Los plásmidos se purificaron con el Kit de Wizard plus DNA purification system (Promega) y la presencia de la inserción se confirmó mediante secuenciación de ADN. Una vez corroboradas las secuencias, los plásmidos se transformaron en células quimiocompetentes de *E. coli* SCS110 para posteriormente poder electroporarlos en células vegetativas de Bt 407 .

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

La transformación en las células de *E. coli* SCS110 se realizó por choque térmico, a 50 μ l de células se le agregaron 5 μ l de ADN y se incubaron durante 30 min en hielo, posteriormente se dio un choque de calor a 42°C durante dos min y se incubaron una vez más en hielo durante 5 min transcurrido el tiempo las células se colocaron en 800 μ l de LB líquido sin antibiótico y se incubaron 1 h a 37°C en agitación. Posteriormente, en 5 ml de medio LB-ampicilina (100 μ g/ml) se agregaron 200 μ l del cultivo anterior y se crecieron durante 12 h a 37°C. Los

plásmidos se purificaron con el Kit de Wizard plus DNA purification system (Promega) y se electroporaron en las células de Bt 407.

Transformación en células acristalíferas 407⁻ de *Bacillus thuringiensis*.

Para la transformación en las células acristalíferas 407⁻ de Bt, se agregaron 10 µl de ADN a 200 µl de células y se incubaron durante 5 min en hielo, posteriormente las células más el ADN fueron transferidos a celdas de 0.4 cm (BioRad) pre-enfriadas y se les aplicó un pulso de 2.5 V a 25µF y 1000 Ω de resistencia. Las células electroporadas se incubaron una vez más en hielo durante 5 min, posteriormente se les agregaron 700 µl de medio BHI y se incubaron 1 h a 37°C en agitación, transcurrido el tiempo se tomaron 250 µl de células y se sembraron en cajas de LB-eritromicina (10 µg/ml) y se incubaron 12 h a 37°C.

Para corroborar que efectivamente las colonias obtenidas en Bt contienen las variantes de la toxina Cyt1Aa [CytA3-Asa(n); CytA2-Asa(n)], se seleccionó un par de colonias de cada una de las variantes y se realizó una Miniprep. Los plásmidos obtenidos de cada una de las variantes a partir de Bt se utilizaron como templados para amplificar el gen de la toxina Cyt1Aa y secuenciar este ADN en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología- UNAM.

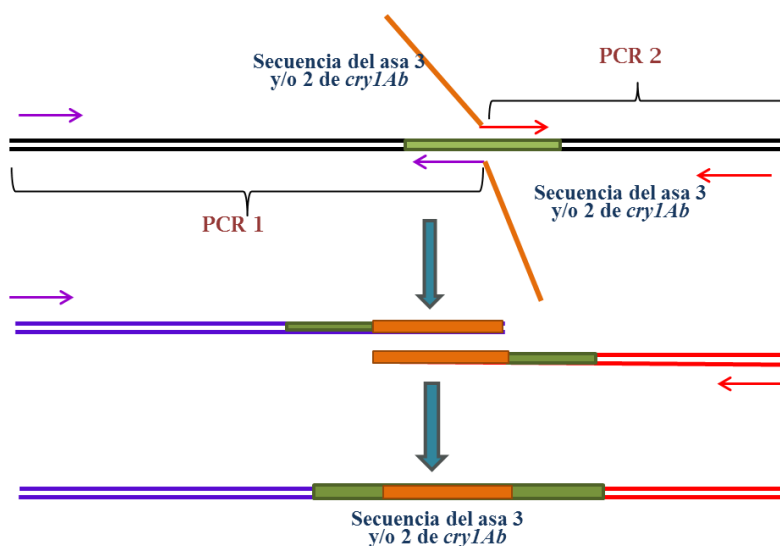


Figura 9. Estrategia para introducir el asa 2 y asa 3 de Cry1Ab en las distintas asas de la toxina Cyt1Aa.

Tabla 5. Oligos mutagénicos para la inserción del asa 2 de Cry1Ab en las asas 6, 7 y 9 de la toxina Cyt1Aa [CytA2-Asa(n)].

Asa	PCR	Oligo	Secuencia del oligo
6	1	F-loop6A2	TATAGAAGACCATTTAATATTGGAATTAATAATCAA
		R-loop6A2+200	TTACTGCTGATACTTTAATTTCAAAAACCAACTG
	2	F-loop6-200*	GATGCCCTACGCTTTAGTATG
		R-loop6A2	TCCAATATTAATGGTCTTCTATA
7	1	F-loop7A2	TATAGAAGACCATTTAATATTGGAATTAATAATCAA
		R-loop6+200*	TTACTGCTGATACTTTAATTTCAA
	2	F-loop7-200*	CCCTACGCTTTAGTATG
		R-loop7A2	TCCAATATTAATGGTCTTCTATA
9	1	F-loop9asa	TATAGAAGACCATTTAATATTGGAATTAATAATCAA
		R-loop9+200*	TAATGGTTGTGCAAATTTCAA
	2	F-loop9-200	GGTGTGTAGTGAGTTATGTTGAT
		R-loop9asa	TCCAATATTAATGGTCTTCTATA

La región resaltada en amarillo corresponde a la secuencia del asa 2 del gen de Cry1Ab. La secuencias de los oligos están denotadas en dirección 5'-3'.

Tabla 4. Oligos mutagénicos para la inserción del asa 3 de Cry1Ab en las asas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de la toxina Cyt1Aa [CytA3-Asa(n)].

Asa	PCR	Oligo	Secuencia del oligo
1	1	F-loop1asa	TTAGAAAGTGGATTTAGTAATAGTAGTGAAGTATTCTATTAACGAAATTGATAATCC
		R-loop1+200	TTACATTTTGATCAACATAACTCA
	2	F-loop1-200	AATTTATTATGTTACTTTATATTTGAT
		R-loop1asa	ACTATTACTAAATCCACTTCTAAAAGAAAGATTATTGATTTCAATTTGG
2	1	F-loop2asa	TTAGAAAGTGGATTTAGTAATAGTAGTGAAGTATTATATATTGCAAGCAATTATGTTA
		R-loop1+200	TTACATTTTGATCAACATAACTCA
	2	F-loop1-200	AATTTATTATGTTACTTTATATTTGAT
		R-loop2asa	ACTATTACTAAATCCACTTCTAAAATTCCGATTATCAATTTCCGTTAATAGA
3	1	F-loop3asa	TTAGAAAGTGGATTTAGTAATAGTAGTGAAGTATTGATGCCCTACGCTTTAGTAT
		R-loop3+200	ACTTAATGCAACTCCTAATACAGT
	2	F-loop3-200	ATTAGAAGATATAAAGGTAAA
		R-loop3asa	AATACTTACACTACTATTACTAAAACCAAATCTGTAGAAGTGG
4	1	F-loop4asa	TTAGAAAGTGGATTTAGTAATAGTAGTGAAGTATTGGTGVGTAGTGAGTTATGTTGAT
		R-loop3+200	ACTTAATGCAACTCCTAATACAGT
	2	F-loop4-200	TAAATCCATGGAAAACCCCTCAAT
		R-loop3asa	AATACTTACACTACTATTACTAAACATCGGTGTAATTGTGTTTGCAT
5	1	F-loop5asa	TTAGAAAGTGGATTTAGTAATAGTAGTGAAGTATTTAAGTGGATCTGTAATAGATCAA
		R-loop6+200	TACTGCTGATACTTTAATTTCAA
	2	F-loop6-200	GATGCCCTACGCTTTAGTATG
		R-loop6asa	ACTATTACTAAATCCACTTCTAAAAGCAACTCCTAATACAGTTTTTAACACTTC
6	1	F-loop6asa	TTAGAAAGTGGATTTAGTAATAGTAGTGAAGTATTTAACTGCAGCAGTTACAAATACG
		R-loop6+200	TACTGCTGATACTTTAATTTCAA
	2	F-loop6-200	GATGCCCTACGCTTTAGTATG
		R-loop6asa	ACTATTACTAAATCCACTTCTAAAATTGATCTATTACAGATCCACTTAA
7	1	F-loop7asa	TTAGAAAGTGGATTTAGTAATAGTAGTGAAGTATTACTCAAAAAATGAAGCATGGAT
		R-loop6+200	TACTGCTGATACTTTAATTTCAA
	2	F-loop7-200	CCCTACGCTTTAGTATG
		R-loop7asa	ACTATTACTAAATCCACTTCTAAAATTAAATTTGTAACGTAT
8	1	F-loop8asa	TTAGAAAGTGGATTTAGTAATAGTAGTGAAGTATTGGATTTCTGGGGCAAGGAA
		R-loop6+200	TACTGCTGATACTTTAATTTCAA
	2	F-loop7-200	CCCTACGCTTTAGTATG
		R-loop8asa	ACTATTACTAAATCCACTTCTAAAAGCTTCATTTTTTTGAGTAT
9	1	F-loop9asa	TTAGAAAGTGGATTTAGTAATAGTAGTGAAGTATTCAAACAAATTACACATACAAT
		R-loop9+200	TAATGGTTGTGCAAATTTCAA
	2	F-loop9-200	GGTGCTGTAGTGAGTTATGTTGAT
		R-loop9asa	ACTATTACTAAATCCACTTCTAAAATTAGCAGTTTCCTTGCCCA
10	1	F-loop11asa	TTAGAAAGTGGATTTAGTAATAGTAGTGAAGTATTGGCGTTATGTATTGTGTACC
		R-loop9+200	TAATGGTTGTGCAAATTTCAA
	2	F-loop9-200	GGTGCTGTAGTGAGTTATGTTGAT
		R-loop11asa	ACTATTACTAAATCCACTTCTAAAACCAGTTTGGGCATTTGGAT

La región resaltada en amarillo corresponde a la secuencia del asa 3 del gen de Cry1Ab. La secuencias de los oligos están denotadas en dirección 5'-3'.

6.5. Obtención de los cristales de las toxinas Cry11Aa, Cyt1Aa y de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab.

Para la obtención de los cristales de la toxina Cyt1Aa silvestre y de las variantes de la toxina Cyt1Aa, las cepas de Bt se crecieron en cajas Petri con medio HCT-agar (medio de esporulación; Schaeffer, *et al.*, 1965) suplementado con eritromicina 10 µg/ml y se incubaron durante 4 días a 30°C, para la toxina Cry11Aa las cajas se suplementaron con eritromicina 25 µg/ml y se dejaron incubando durante 3 días a 30°C. La producción de cristales se verificó a través de observaciones en un microscopio de luz. El complejo de esporas-cristales de cada una de las toxinas se recuperó y se lavó 5 veces en una solución de lavado (NaCl 0.3 M, 0.01 M EDTA, pH 8) y cada lavado se realizó centrifugando el complejo durante 10 min a 10,000 rpm a 4°C, posteriormente el sobrenadante se desechó y la pastilla se lavó cuatro veces en una solución de agua con 1 mM PMSF (fenil metanosulfonil fluoruro) centrifugando como en el paso anterior. Los cristales de la toxina Cry11Aa se purificaron mediante un gradiente discontinuo de sacarosa (Thomas y Ella, 1983b) y para los cristales de la toxina Cyt1Aa silvestre y de las variantes de la toxinas Cyt1Aa se utilizó un sistema acuoso de dos fases (Güereca, *et al.*, 1994). La cuantificación de la proteína total se realizó por medio de la técnica de Bradford (Bradford, 1976) y por densitometría utilizando una curva de BSA en gel. El perfil proteico se visualizó en un SDS-PAGE al 15%.

Purificación mediante gradientes de sacarosa.

Las pastillas recuperadas después de los lavados se resuspendieron en 5 ml de una solución amortiguadora TTN (0.02 M Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 0.01% Tritón X-100 pH 7.2) y se sonicaron dando 3 pulsos de 50 seg a 20 Watts con 1 minuto de descanso en hielo entre cada sonicación. Los gradientes discontinuos se prepararon utilizando 84%, 79%, 72% y 67% de sacarosa y cada uno se complementó con buffer TTN. Los gradientes se centrifugaron 30 min a 23,000

rpm a 15°C en una ultracentrífuga Beckman con el mínimo de aceleración y desaceleración. Posteriormente, se recuperó de manera independiente cada una de las fracciones y se lavaron tres veces en una solución de agua con 1 mM PMSF centrifugando 15 min a 10,000 rpm a 4°C. Los cristales se resuspendieron en la solución de lavado y se guardaron a 4°C.

Purificación mediante el sistema acuoso de dos fases.

El sistema acuoso de dos fases está constituido por un buffer de fosfatos al 40% (15 gr K₂HPO₄, 5 gr KH₂PO₄, 30 gr H₂O) y polietilenglicol (PEG) al 40% (20 gr PEG 4000, 30 gr H₂O). Cada suspensión de espora-cristal recuperada después de los lavados, se resuspendió en una solución de Triton X-100 al 0.01% (0.2 gr de suspensión de esporas-cristales, 0.2 ml Triton X-100 0.01% v/v) e inmediatamente se adicionó 1 gr de H₂O y 1.6 gr de PEG al 40% y se homogenizó mediante un vortex. Posteriormente, se adicionó 1 gr de buffer de fosfatos al 40% y se homogenizó una vez más. Las muestras se centrifugaron durante 1 min a 500 rpm a 4°C, recuperando los cristales en la interface. Los cristales recuperados se colocaron en un falcón de 15 ml y se lavaron 5 veces en una solución de agua con 1 mM PMSF centrifugando 10 min a 10,000 rpm a 4°C. Finalmente los cristales se resuspendieron en la solución de lavado y se guardaron a 4°C.

6.6. Solubilización de los cristales de las toxinas Cyt1A y de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab.

Los cristales purificados de las toxina Cyt1Aa silvestre y de las variantes de la toxinas Cyt1Aa se resuspendieron en una solución de NaOH 0.05 M con 1 mM de DTT y 1 mM de PMSF. Las muestras se incubaron durante 1 h a 4°C en agitación. La proteína soluble se recuperó por centrifugación a 14,000 rpm durante 10 min a 4°C y la pastilla se descartó. Posteriormente las muestras se dializaron en PBS pH

10 (0.2 M NaH₂PO₄, 0.4 M Na₂HPO₄, 1 M NaCl) utilizando una membrana de diálisis (Cellu Sep T3, MWCO 12-14). Para corroborar que los cristales se solubilizaron y dializaron adecuadamente se tomaron 10 µl del sobrenadante y se visualizaron en un SDS-PAGE al 15%.

6.7. Activación de las protoxinas de Cyt1Aa y de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab.

Para la activación de las protoxinas de la toxina Cyt1A silvestre y de las variantes de las toxinas Cyt1Aa, se tomaron 600 µg de protoxina y se le agregaron 120 µl de Tris-HCl pH 8 1M, posteriormente se agregó tripsina 1:50 w/w (enzima:sustrato) y se incubaron durante 1 h a 4°C en agitación, una vez terminado el periodo de incubación la reacción se inhibió con 1 mM de PMSF. La proteína activada se recuperó por centrifugación a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C, la pastilla se descartó. Para corroborar que la activación fue eficiente se tomaron 10 µl del sobrenadante y se visualizaron en un SDS-PAGE al 15%.

6.8. Inmunoblot.

Para la realización del Inmunoblot se tomaron 0.2 µg de proteína (toxina complejo espora-cristal, toxina solubilizada y toxina activada) a los cuales se les adicionó 10 µl de H₂O y 2.4 µl de solución de carga (Laemmli), la mezcla se calentó durante 5 min y se separó mediante un SDS-PAGE al 15%. Posteriormente se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF; Millipore, Bedford, MA) durante 45 min a 350 mA. La membrana se bloqueó durante 2 h en agitación con leche descremada al 5% en PBST (PBS-Tween al 0.1%). Posteriormente la membrana se lavó tres veces con PBST. Una vez concluidos los lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo anti-cyt1Aa (1:30,000 diluido en PBST) durante 1 h en agitación. Transcurrido el tiempo de

incubación, la membrana se lavó tres veces con PBST y se incubó con anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa (HRP; Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX) en una dilución 1:30,000, durante 1 h en agitación. Finalmente, la membrana se lavó tres veces con PBST y la detección se realizó con el reactivo luminol Sc-2048 (Santa Cruz Biotechnology). La membrana se visualizó mediante el equipo Imager 600 (Amersham, Pittsburgh, PA). En todos los SDS-PAGE se utilizó un marcador de peso molecular de proteínas preteñido de la compañía Thermo Scientific, Waltham MA.

6.9. Ensayos de unión de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab a los receptores CDR, APN y ALP de *M. sexta*.

Los ensayos de unión de las variantes de las toxinas Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 a los receptores CDR, APN y ALP de *M. sexta*, se realizaron mediante ensayos de ELISA. Los receptores fueron purificados por la Dra. Isabel Gómez, investigadora asociada del grupo de investigación del Dr. Mario Soberón a partir de clonas de *E. coli* que expresan estas proteínas. Para los ensayos de unión se utilizó una concentración de 0.5 µg de receptor y 50 nM de toxina Cyt1A silvestre y/o de las variantes de las toxinas Cyt1Aa. Las concentraciones mencionadas arriba son las que se utilizaron por pozo. Como control positivo se utilizó la toxina Cry1Ab silvestre (toxina que une a los receptores ALP, APN y CDR de *M. sexta*), y como control negativo la toxina Cyt1Aa silvestre (toxina que no une a los receptores de *M. sexta*).

Los receptores (0.5 µg en 100 µl de PBS) se fijaron en placas de ELISA durante 12 h a 4°C. El exceso de receptor se eliminó mediante 5 lavados con PBS. Posteriormente, las placas se bloquearon durante 2 h a 37°C con 200 µl de leche descremada al 2% en PBS. El exceso de leche se eliminó mediante 5 lavados con PBS. Inmediatamente a cada pozo se le agregó la toxina Cyt1Aa y/o las variantes de las toxinas Cyt1Aa (50 nM en 100 µl de PBST) y las placas se incubaron 1 h a

37°C. El exceso de toxina que no se unió, se eliminó mediante 5 lavados con PBST y 2 con PBS. Después de realizar los lavados, a cada pozo se le agregó 100 µl del anticuerpo primario anti-Cyt1Aa (1:4000) diluido en PBST, las placas se incubaron durante 1 h a 37°C. El exceso de anticuerpo se eliminó como en el paso anterior. Posteriormente, a cada pozo se le agregó 100 µl de anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (1:10,000) y las placas se incubaron durante 1 h a 37°C. El exceso de anticuerpo se eliminó como en el paso anterior. Finalmente, el ensayo de ELISA se reveló con OPD (O-fenilendiamina; Sigma) en una solución de fosfato de sodio (0.1 M, pH 5). La absorbancia se leyó a 490 nm. Cada experimento se llevó a cabo por duplicado con un total de 6 repeticiones para cada una de las variantes de las toxinas Cyt1Aa y la toxina Cyt1Aa silvestre.

Para determinar si existen diferencias estadísticas entre las variantes de la toxina Cyt1Aa en la unión a los receptores, los datos fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación múltiple de medias a través de una prueba de Tukey a un nivel de significancia del 0.05. El análisis de los datos se realizó en el programa estadístico SAS versión 9.0.

6.10. Ensayos de la actividad hemolítica de las toxinas Cyt1Aa y de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab.

La actividad hemolítica de las toxinas Cyt1Aa silvestre y de las variantes de la toxina Cyt1Aa [CytA3-Asa(n); CytA2-Asa(n)] se evaluó en eritrocitos de conejo. Para los ensayos de hemólisis se utilizó sangre fresca, la cual se colocó en una solución anticoagulante (Alsever's; Dextrosa 0.11 M, NaCl (Cloruro de Sodio) 0.07 M, Na₃C₆H₅O₇ (Citrato de Sodio) 0.02 M, C₆H₈O₇ (Ácido cítrico) 0.002 M, pH 7.4). Para eliminar el plasma sanguíneo y otros componentes de la sangre, ésta se centrifugó durante 5 min a 2500 rpm a 4°C, con un mínimo de aceleración y desaceleración de 2. Después de la centrifugación se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió suavemente con solución Alsever's. Este proceso se

repitió hasta que el sobrenadante se observó transparente. Posteriormente, se realizó una curva de calibración en porcentaje de hemólisis.

Para analizar el 100% de hemólisis se tomaron 50 μ l de eritrocitos y se colocaron en 950 μ l de agua destilada, para el 0% de hemólisis se tomaron 50 μ l de eritrocitos y se colocaron en 950 μ l de solución Alsever's. Los tubos con estas mezclas se agitaron suavemente y se centrifugaron durante 5 min a 2500 rpm a 4°C. Inmediatamente se recuperó el sobrenadante y se leyó la absorbancia de este a una densidad óptica (DO) de 405 nm. Para el 100% de hemólisis se consideraron valores de DO_{405} entre 1 y 1.1; para el 0% de hemólisis se consideró una DO_{405} entre 0.01 y 0.03.

Para la reacción de hemólisis los eritrocitos de conejo previamente calibrados se incubaron con ocho diferentes concentraciones de toxina Cyt1Aa y de las variantes de la toxina Cyt1Aa (125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 ng/ml). Se utilizaron 20 μ l de eritrocitos en 180 μ l de mezcla toxina/solución Alsever's y el volumen final (200 μ l) se colocó en placas de 96 pozos con fondo plano. Las placas se incubaron durante 30 min a 37°C sin agitación. Posteriormente, las placas se centrifugaron durante 5 min a 2500 rpm a 4°C con una aceleración y desaceleración de 2. Los sobrenadantes se recuperaron y se colocaron en una placa nueva de 96 pozos. Los valores de absorbancia de la hemólisis se determinaron en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 405 nm. Los ensayos de hemólisis se realizaron por triplicado con un total de 9 repeticiones para cada una de las toxinas.

6.11. Bioensayos de toxicidad de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab en larvas de *M. sexta*, *P. xylostella* y *A. aegypti*.

La actividad insecticida de las toxinas Cyt1Aa silvestre y de las variantes de la toxinas Cyt1Aa [CytA3-Asa(n); CytA2-Asa(n)] se evaluó en larvas de *M. sexta*, *P. xylostella* (lepidópteros) y *A. aegypti* (díptero). La actividad sinérgica de las toxinas Cyt1Aa silvestre y de las variantes de las toxinas Cyt1Aa en larvas de *A. aegypti* se evaluó en combinación con la toxina Cry11Aa. La concentración letal media (CL₅₀) se calculó a través de un análisis Probit, utilizando el programa estadístico Polo-Plus LeOra Software. Para determinar si existen diferencias estadísticas entre las variantes de la toxina Cyt1Aa en toxicidad, los datos se analizaron por medio de un ANOVA y una prueba de Tukey a un nivel de significancia del 0.05. El análisis de los datos se realizó en el programa estadístico SAS versión 9.0.

Bioensayos en *M. sexta* y *P. xylostella*.

Los bioensayos se realizaron utilizando el método de contaminación de superficie, utilizando el complejo espora-cristal de cada una de las toxinas (Cyt1Aa silvestre, variantes de la toxina Cyt1Aa y Cry1Ab). En placas de 24 pozos se colocó dieta artificial y una vez que la dieta se secó se agregó la dosis de la toxina (2 µg/cm²) en agua aforando a un volumen final de 35 µl, las cajas se dejaron secar y posteriormente se colocó una larva en cada pozo. Como control positivo se utilizó la toxina Cry1Ab (0.5 ug/cm²) y como controles negativos agua y la toxina Cyt1A silvestre (2 µg/cm²). La unidad experimental para los bioensayos en *M. sexta* consistió en una caja cell-well de 24 pozos con 24 larvas de primer instar y la unidad experimental para los bioensayos en *P. xylostella* consistió en una caja cell-well de 24 pozos con 24 larvas de tercer estadio, los bioensayos se realizaron por triplicado con un total de 9 repeticiones y la mortalidad de las larvas se monitoreó a los siete y 14 días.

Bioensayos en *A. aegypti*.

Los bioensayos se realizaron en un volumen final de 10 ml utilizando cinco diferentes concentraciones (1000, 1500, 2000, 5000 y 10000 ng/ml) de complejo espora-cristal o proteína soluble de las toxinas Cyt1Aa silvestre y de las variantes de las toxinas Cyt1Aa. Para los bioensayos con el complejo espora-cristal la unidad experimental consistió en 10 larvas de tercer instar en 10 ml de agua y para los bioensayos con la proteína soluble consistió en 10 larvas de primer instar en 1 ml de agua, como control positivo se utilizó la toxina Cyt1Aa silvestre (1500 ng/ml) y como control negativo agua. Los bioensayos se realizaron por triplicado con un total de nueve repeticiones para cada una de las variantes, la mortalidad se registró a las 24 y 48 h.

Los bioensayos de sinergismo se evaluaron utilizando una mezcla del complejo espora-cristal de la toxina Cry11Aa con el complejo espora-cristal de las toxinas Cyt1Aa silvestre o de las variantes de las toxinas Cyt1Aa, como control positivo se utilizó la mezcla de las toxinas Cry11Aa silvestre y Cyt1Aa silvestre y como control negativo agua. Para evaluar el sinergismo se utilizaron tres distintas proporciones de la mezcla de las toxinas Cyt1Aa: Cry11Aa (1:1, 1:3 y 1:5 en una concentración final de 50 ng). La unidad experimental consistió en 10 larvas de tercer instar en 10 ml de agua. Los bioensayos se realizaron por triplicado con un total de 9 repeticiones y la mortalidad se registró a las 24 h. El factor de sinergismo para la mezcla de las toxinas Cyt1Aa silvestre y Cry11Aa silvestre se calculó de acuerdo a la ecuación de Tabashnik (Tabashnik, 1992), en donde los valores teóricos de la CL_{50} es la media armónica de los valores de la CL_{50} experimental de cada uno de los componentes ponderado por la proporción usada en las mezclas: $CL_{50} (A+B) = [(rA/ CL_{50} (A)) + (rB/ CL_{50} (B))]^{-1}$ donde A= Toxina Cyt1Aa híbrida, B = Toxina Cry11Aa, rA y rB = son las proporciones de toxina Cyt1Aa o Cry11Aa utilizadas en la mezcla final, $CL_{50} (A)$ y $CL_{50} (B)$ son los valores de la CL_{50} para cada una de las toxinas. El factor de sinergismo (FS) se calculó al

dividir la toxicidad teórica entre la toxicidad observada en los bioensayos utilizando las mezclas de toxinas. Un valor de FS mayor a 1 indica sinergismo.

El sinergismo para la mezcla de las variantes de las toxinas Cyt1Aa y Cry11Aa silvestre se calculó determinando la mortalidad teórica $((1-S_{(Cyt1Aa, Cry11Aa)EXP}) \times 100\%)$ que se obtendría al mezclar cada una de las variantes de las toxinas Cyt1Aa con la toxina Cry11A silvestre y comparar este valor con la mortalidad experimental $(S_{(Cyt1Aa, Cry11Aa)EXP} = S_{(Cyt1Aa)OBS} \times S_{(Cry11Aa)OBS})$ como se reportó anteriormente por Fernández-Luna y colaboradores (2010). En donde $S_{(Cyt1Aa, Cry11Aa)EXP}$ es la proporción de larvas que se espera que sobrevivan a la exposición de la mezcla de las toxinas. $S_{(Cyt1Aa)OBS}$ corresponde a la proporción de larvas que sobrevivieron a la exposición de la toxina Cyt1Aa y $S_{(Cry11Aa)OBS}$ corresponde a la proporción de larvas que sobrevivieron a la exposición de la toxina Cry11Aa.

7. RESULTADOS

7.1. Construcción y expresión de las variantes de las toxinas Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab.

La construcción de las variantes de la toxina Cyt1Aa con la inserción del asa 3 y asa 2 de Cry1Ab [CytA3-Asa(n); CytA2-Asa(n)] se llevó a cabo por medio de reacciones de PCR de empalme, para ello se utilizó como templado el plásmido PWF45 (el cual contiene a la toxina Cyt1Aa) y se utilizaron oligos específicos para cada una de las asas (ver metodología). El producto de PCR de las reacciones se transformó en células de *E. coli* DH5 α seleccionando por resistencia a ampicilina. El plásmido con la inserción secuenciada se utilizó para transformar en células acristalíferas 407⁻ de Bt, seleccionando por resistencia a eritromicina con la finalidad de obtener los cristales de las variantes de la toxina Cyt1Aa. Las cepas de Bt correspondientes a cada una de las variantes, se crecieron en un medio de esporulación HCT suplementado con eritromicina durante cuatro días. La separación y concentración de los cristales se realizó a través de un sistema de dos fases constituido por un buffer de fosfatos y polietilenglicol (ver metodología).

En la figura 10A se puede observar que de las 10 variantes de la toxina Cyt1Aa que contienen la inserción del asa 3 de Cry1Ab en las distintas asas de la toxina Cyt1Aa [CytA3-Asa(n)] solo se expresaron siete. Las variantes correspondientes a las asas 1, 2 y 3 de la toxina Cyt1Aa (CytA3-Asa1, CytA3-Asa2, CytA3-Asa3) fueron inestables al momento de realizar la purificación de los cristales (datos no mostrados), razón por la cual no fueron consideradas para llevar a cabo las pruebas de solubilización, activación, inmunodetección, ensayos de toxicidad y unión a los receptores APN, ALP y CDR. En la figura 10B se muestra la expresión de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 de Cry1Ab en las asas 6, 7 y 9 (CytA2-Asa6, CytA2-Asa7, CytA2-Asa9). La decisión de llevar a cabo la inserción del asa 2 de Cry1Ab, solo en las asas 6, 7 y 9 de la toxina Cyt1Aa, se realizó con base en los resultados obtenidos en los ensayos de unión y

toxicidad para las variantes con la inserción del asa 3 de Cry1Ab. Los resultados obtenidos en ambos ensayos, sugieren que la inserción del asa 3 en las asas 6, 7 y 9 de la toxina Cyt1Aa incrementan de manera significativa (ANOVA; $P < 0.001$) la toxicidad en larvas de *M. sexta* y *P. xylostela*, lo cual correlaciona con un incremento en la unión de estas tres variantes a los receptores APN, ALP y CDR, de *M. sexta*.

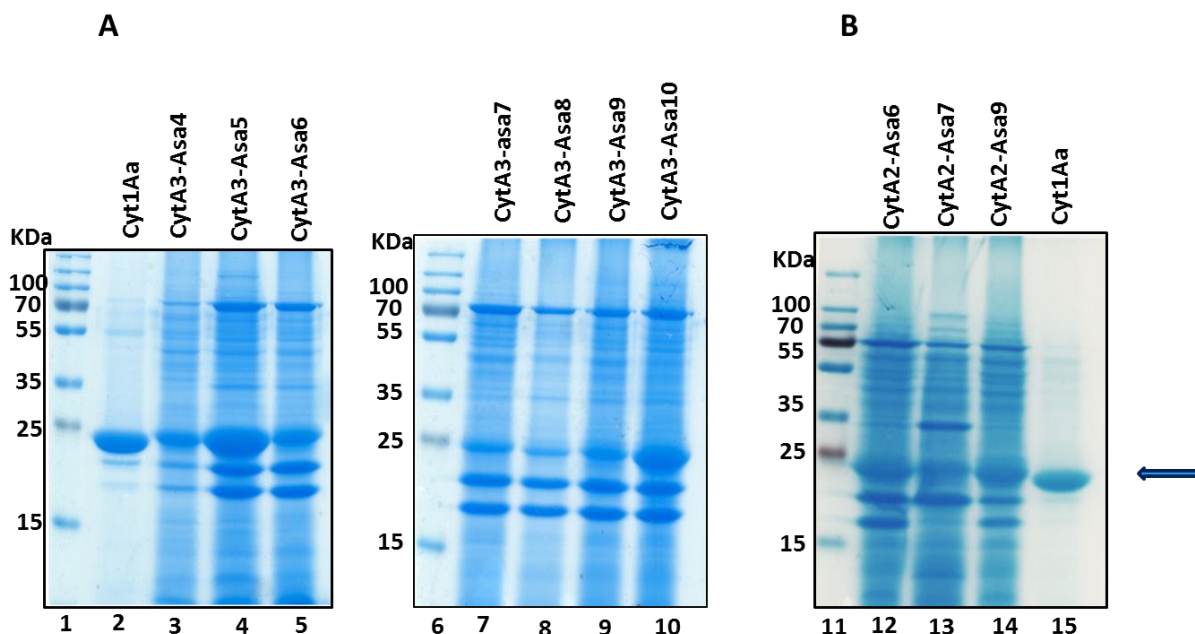


Figura 10. Separación y concentración de los cristales de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o asa 3 de Cry1Ab. Carril 1, 6 y 11 marcador de peso molecular; carril 2 y 15, toxina Cyt1Aa silvestre. **A)** Variantes de la toxina Cyt1Aa con la inserción del asa 3 de Cry1Ab. Carril 3, (CytA3-Asa4) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 4; carril 4, (CytA3-Asa5) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 5; carril 5, (CytA3-Asa6) de Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 6; carril 7, (CytA3-Asa7) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 7; carril 8, (CytA3-Asa8) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 8; carril 9, (CytA3-Asa9) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 9; carril 10, (CytA3-Asa10) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 10. **B)** Variantes de la toxina Cyt1Aa con la inserción del asa 2 de Cry1Ab. Carril 12, (CytA2-Asa6) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 6; carril 13, (CytA2-Asa7) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 7; carril 14, (CytA2-Asa9) de Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 9; la flecha indica el tamaño esperado de la proteína.

Con base a los resultados mostrados anteriormente, se puede inferir que la inserción de las asas 3 y 2 de Cry1Ab en las distintas asas de la toxina Cyt1Aa, permiten que estas variantes de la toxina Cyt1Aa se puedan plegar y producir cristales semejantes a los cristales formados por la toxina Cyt1Aa silvestre. En

todos los carriles del gel de poliacrilamida al 15% en donde se analizó el complejo espora-cristal de las variantes de la toxina Cyt1Aa y de la toxina Cyt1Aa silvestre, se pueden observar una serie de bandas de ~70 kDa las cuales podrían ser otras proteínas producidas por Bt o podrían ser agregados de la misma toxina Cyt1Aa. De igual manera se pueden observar una serie de bandas por debajo del tamaño esperado de la protoxina de Cyt1Aa (~25 kDa), sugiriendo que podrían ser productos de degradación de la misma toxina, debido a que durante el crecimiento exponencial de Bt ésta puede llegar a producir una gran cantidad de proteasas en el medio de cultivo (Agaisse y Lereclus, 1995).

7.2. Análisis de la estabilidad de las variantes las toxinas Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab.

Para corroborar que las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 3 y 2 de Cry1Ab expresadas en Bt son estables, se realizaron pruebas de solubilización y activación. En el proceso de solubilización y activación, se trata de simular las condiciones alcalinas y reductoras que pudieran encontrarse en los intestinos de las larvas de los insectos.

Analizar el proceso de solubilización de las toxinas es un paso determinante, debido a que durante esta etapa es cuando se libera la protoxina del cristal para poder actuar contra su blanco. La solubilización de la toxina Cyt1Aa silvestre se realizó con Buffer de Carbonatos pH10.5 con 0.02% de Mercaptoetanol a 37°C 1 h a una agitación de 600 rpm y para la solubilización de las variantes se utilizó una solución de NaOH 50 mM con DTT 1 mM y PMSF 1 mM a 4°C 1hr a una agitación de 700 rpm. El perfil proteico se determinó a través de un gel de poliacrilamida al 15%. En la figura 11A se muestra la electroforesis de las proteínas solubilizadas de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 3 de Cry1Ab [CytA3-Asa(n)] y en la figura 11B la electroforesis correspondiente a la

solubilización de las proteínas de las variantes con la inserción del asa 2 de Cry1Ab [CytA2-Asa(n)].

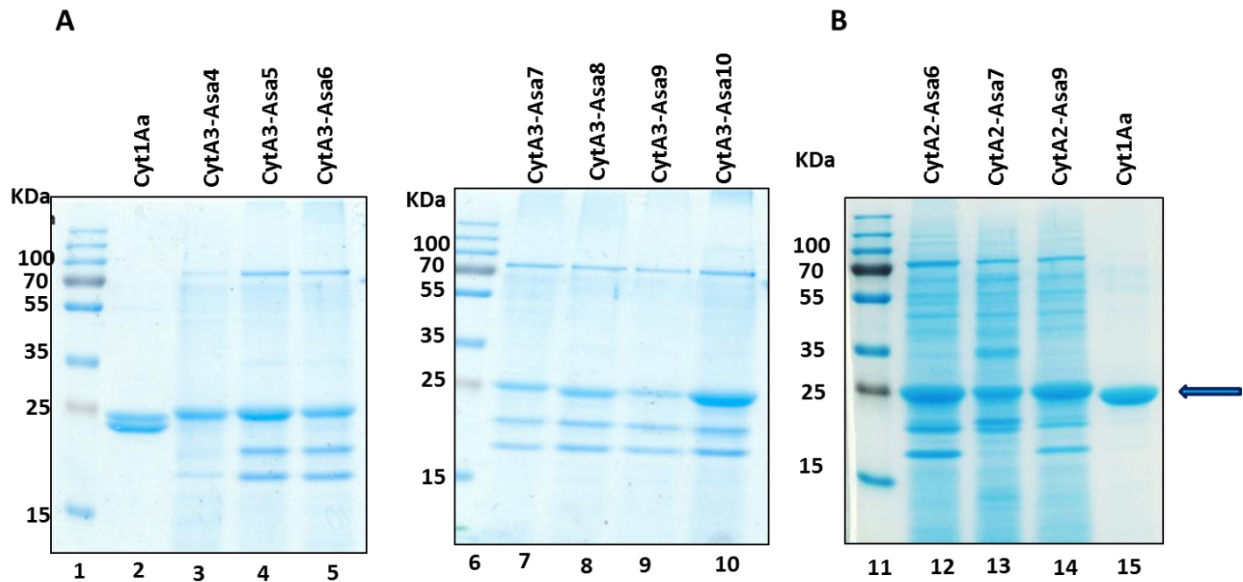


Figura 11. Solubilización de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o asa 3 de Cry1Ab. Carriles 1, 6 y 11, marcador de peso molecular. **A)** Variantes de la toxina Cyt1Aa con la inserción del asa 3 de Cry1Ab. Carril 2 y 15, toxina Cyt1Aa silvestre; carril 3, (CytA3-Asa4) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 4; carril 4, (CytA3-Asa5) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 5; carril 5, (CytA3-Asa6) de Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 6; carril 7, (CytA3-Asa7) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 7; carril 8, (CytA3-Asa8) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 8; carril 9, (CytA3-Asa9) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 9; carril 10, (CytA3-Asa10) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 10. **B)** Variantes de la toxina Cyt1Aa con la inserción del asa 2 de Cry1Ab. Carril 12, (CytA2-Asa6) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 6; carril 13, (CytA2-Asa7) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 7; carril 14, (CytA2-Asa9) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 9; la flecha indica el tamaño esperado de la proteína.

Como se muestra en la figura 11, las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 3 y el asa 2 de Cry1Ab en las distintas asas de la toxina Cyt1Aa [CytA3-Asa(n), CytA2-Asa(n)], se solubilizan de manera similar a la toxina Cyt1Aa silvestre, indicando que las variantes generadas en este trabajo son estables a las condiciones que pudieran estar presentes en los intestinos de las larvas. Una vez establecidas las condiciones de solubilización, las protoxinas de las variantes de la toxina Cyt1Aa y de la toxina Cyt1Aa silvestre, fueron sujetas a pruebas de activación con tripsina en una proporción de 1:50 w/w

(tripsina:protoxina) a 4°C por 1 h a 650 rpm, el perfil proteico se determinó a través de electroforesis en un gel de poliacrilamida al 15% (Figura 12).

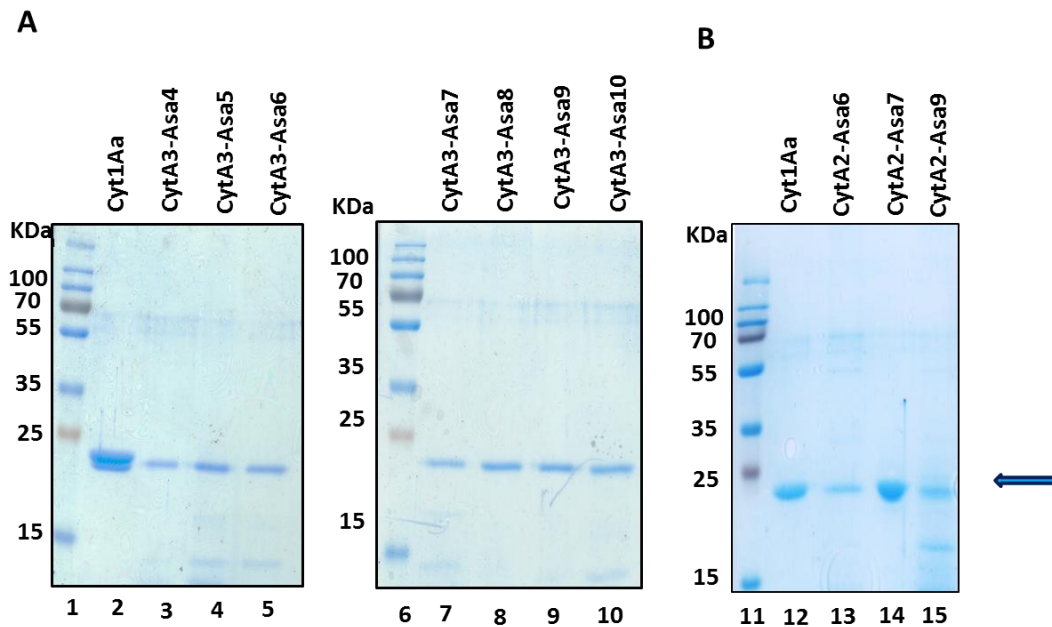


Figura 12. Activación de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o asa 3 de Cry1Ab. Carriles 1, 6 y 11, marcador de peso molecular. **A)** Variantes de la toxina Cyt1Aa con la inserción del asa 3 de Cry1Ab. Carril 2 y 12, toxina Cyt1Aa silvestre; carril 3, (CytA3-Asa4) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 4; carril 4, (CytA3-Asa5) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 5; carril 5, (CytA3-Asa6) de Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 6; carril 7, (CytA3-Asa7) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 7; carril 8, (CytA3-Asa8) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 8; carril 9, (CytA3-Asa9) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 9; carril 10, (CytA3-Asa10) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 10. **B)** Variantes de la toxina Cyt1Aa con la inserción del asa 2 de Cry1Ab. Carril 12, (CytA2-Asa6) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 6; carril 13, (CytA2-Asa7) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 7; carril 14, (CytA2-Asa9) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 9; la flecha indica el tamaño esperado de la proteína.

En la figura 12A se muestra el resultado de la activación de las protoxinas de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 3 de Cry1Ab [CytA3-Asa(n)] y en la figura 12B la activación de las variantes correspondientes a la inserción del asa 2 [CytA2-Asa(n)]. Con base en los resultados obtenidos se corroboró que todas las variantes generadas en este trabajo son estables ante el tratamiento con tripsina y se pueden procesar de manera similar a la toxina Cyt1Aa silvestre.

7.3. Inmunodetección de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab.

Para corroborar que las variantes de la toxina Cyt1Aa [CytA3-Asa(n), CytA2-Asa(n)] que estamos expresando corresponden a la toxina Cyt1Aa, se realizó un ensayo de Inmunodetección de la toxina en espora-cristal, en proteína soluble y en proteína activada, tanto para las variantes que tienen el asa 3 (Figura 13A, B y C, respectivamente) como para las que tienen el asa 2 (Figura 13D, E y F, respectivamente) de Cry1Ab.

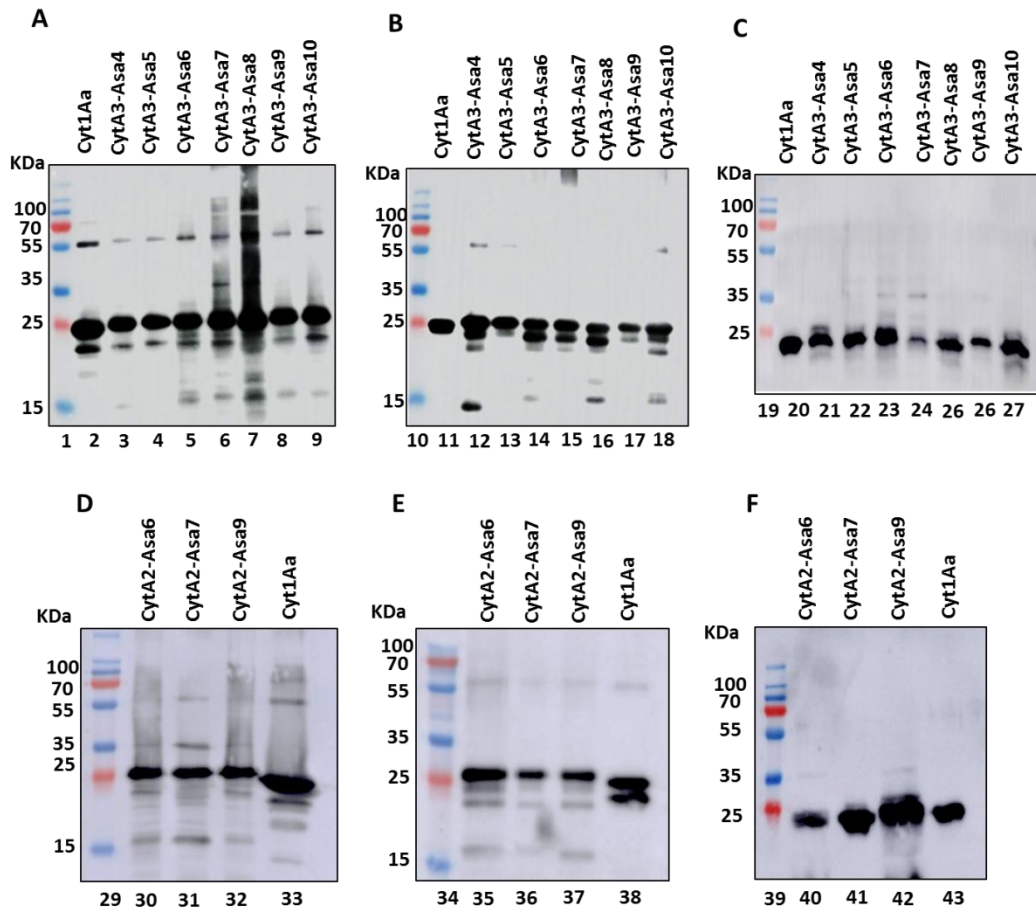


Figura 13. Inmunodetección de las variantes de las toxinas Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o asa 3 de Cry1Ab. Carriles 1, 10, 19, 29, 34 y 39, marcador de peso molecular; Carriles 2, 11, 20, 33, 38 y 43, toxina Cyt1Aa silvestre; Carriles 3, 12 y 21 (CytA3-Asa4) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 4; Carriles 4, 13 y 22 (CytA3-Asa5) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 5; Carriles 5, 14 y 23 (CytA3-Asa6) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 6; Carriles 6, 15 y 24 (CytA3-

Asa7) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 7; Carriles 7, 16 y 25 (CytA3-Asa8) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 8; Carriles 8, 17 y 26 (CytA3-Asa9) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 9; Carriles 9, 18 y 27 toxina (CytA3-Asa10) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 10; Carriles 30, 35 y 40, (CytA2-Asa6) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 6; Carriles 31, 36 y 41, (CytA2-Asa7) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 7; Carriles 32, 37 y 42, (CytA2-Asa9) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 9. (A y D) Espora-cristal; (B y E) Proteína soluble; (C y F) Proteína activada.

En la figura 13 se muestra el resultado de la inmunodetección en complejo espora-cristal, proteína soluble y proteína activada de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 3 de Cry1Ab [CytA3-Asa(n)] y de las variantes correspondientes a la inserción del asa 2 [CytA2-Asa(n)]. Estos datos corroboran que todas las variantes generadas en este trabajo son reconocidas por el anticuerpo anti-Cyt1Aa.

7.4. Ensayos de unión de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab a los receptores APN, ALP y CDR.

Para evaluar si las variantes de las toxinas Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab [CytA3-Asa(n), CytA2-Asa(n)] son capaces de unirse a los receptores APN, ALP y CDR (fragmento de CDR que contiene los CR7-12) de *M. sexta*, se llevaron a cabo ensayos de ELISA. Para los receptores se utilizó una concentración de 0.5 µg y para cada una de las variantes se utilizó una concentración de 50 nM, cada experimento se realizó por triplicado con un total de nueve repeticiones. En la Figura 14A se muestran los resultados de los ensayos de unión llevados a cabo para las variantes del asa 3 [CytA3-Asa(n)] y en la Figura 14B los resultados para las variantes del asa 2 [CytA2-Asa(n)].

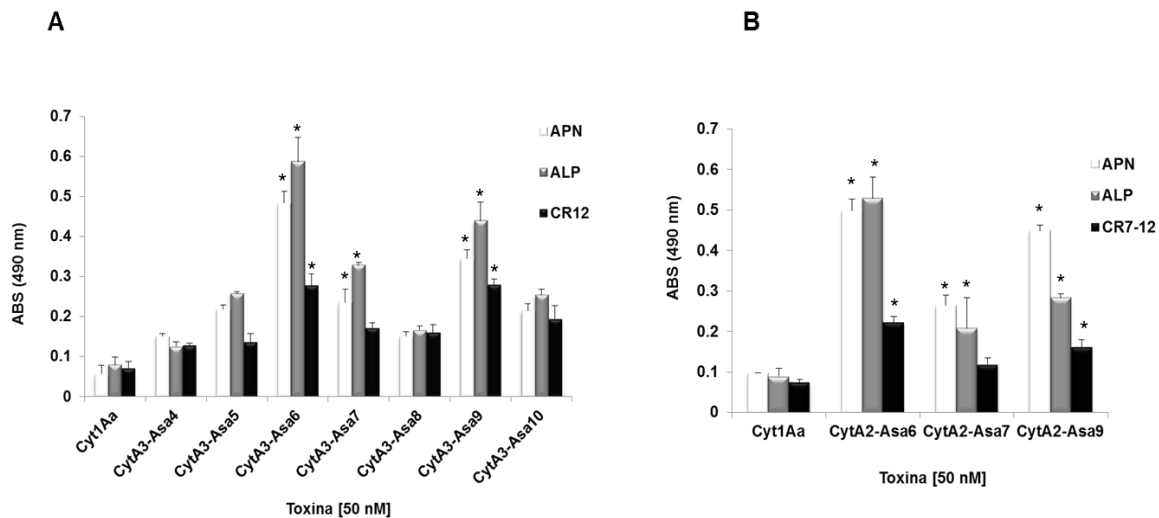


Figura 14. Ensayos de unión de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 3 o asa 2 de Cry1Ab en distintas asas de la toxina Cyt1Aa a los receptores APN, ALP, CRD7-12 de *M. sexta*. **A)** Variantes de la toxina Cyt1Aa con la inserción del asa 3 de Cry1Ab. (CytA3-Asa4) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 4; (CytA3-Asa5) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 5; (CytA3-Asa6) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 6; (CytA3-Asa7) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 7; (CytA3-Asa8) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 8; (CytA3-Asa9) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 9; (CytA3-Asa10) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 10. **B)** Variantes de la toxina Cyt1Aa con la inserción del asa 2 de Cry1Ab. (CytA2-Asa6) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 6; (CytA2-Asa7) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 7; (CytA2-Asa9) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 9. Los * denotan diferencias estadísticas a un nivel de significancia de 0.05 ANOVA ($P < 0.0001$).

En la Figura 14, se puede observar que las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab, mostraron una unión significativa a los receptores APN, ALP y CDR (ANOVA $P < 0.0001$), con valores de absorbancia de entre 0.12 y 0.6 en comparación con la toxina Cyt1Aa silvestre en donde los valores de absorbancia fueron menores de 0.09. Con base en lo anterior se observó un incremento en la unión de 2 a 8 veces al receptor APN, de 2 a 6 veces al receptor ALP y de 1,5 a 4 veces al receptor CDR, en comparación con la toxina Cyt1Aa silvestre la cual no mostró una unión significativa a ninguno de los tres receptores (ANOVA $P < 0.081$). Sin embargo, se puede observar que tanto las variantes del asa 3 [CytA3-Asa(n)], como las del asa 2 [CytA2-Asa(n)] muestran una unión significativa a los receptores ALP y APN en comparación con el receptor CDR (ANOVA $P < 0.0130$).

Al comparar las variantes entre sí, se puede observar que las variantes que tienen la inserción del asa 2 o 3 en las asas 6, 7 y 9 (CytA3-Asa6, CytA3-Asa7, CytA3-Asa9, CytA2-Asa6, CytA2-Asa7, CytA2-Asa9) de la toxina Cyt1Aa, son las que muestran una unión significativa a los receptores ALP y APN (ANOVA $P < 0.0001$), en comparación con el resto de las variantes y la toxina Cyt1Aa silvestre. Los valores de absorbancia en los ensayos de unión para las variantes CytA3-Asa6, CytA3-Asa7, CytA3-Asa9, CytA2-Asa6, CytA3-Asa7 y CytA2-Asa9 al receptor ALP fueron de 0.58, 0.19, 0.44, 0.43, 0.148 y 0.146 respectivamente, y para el receptor APN fueron de 0.483, 0.127, 0.344, 0.526, 0.159 y 0.399 respectivamente. En la figura 14 también se puede observar que la unión al receptor CDR para estas seis variantes (CytA3-Asa6, CytA3-Asa7, CytA3-Asa9, CytA2-Asa6, CytA2-Asa7, CytA2-Asa9) se encuentra disminuida en comparación a los receptores ALP y APN, con valores de absorbancia por debajo de 0.3. Los resultados anteriores, sugieren que las asas 6, 7 y 9 de la toxina Cyt1Aa son sitios potenciales para poder llevar a cabo modificaciones y poder inducir la unión de esta toxina a otras proteínas.

7.5. Ensayos de toxicidad de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 en Larvas de *M. sexta*, *P. xylostela* y *A. aegypti*.

7.5.1. Toxicidad en Larvas de *M. sexta* y *P. xylostela*.

La toxicidad de las variantes de la toxina Cyt1Aa con la inserción del asa 3 de Cry1Ab [CytA3-Asa(n)] se determinó en dos especies de lepidópteros *M. sexta* y *P. xylostela*, en el caso de las variantes con la inserción del asa 2 [CytA2-Asa(n)], solo se realizó en larvas de *M. sexta*. Para los bioensayos se utilizó como control positivo la toxina Cry1Ab ($0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) y como controles negativos agua y la toxina Cyt1A silvestre ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). La unidad experimental para los bioensayos en *M. sexta* consistió en una caja cell-well de 24 pozos con 24 larvas de primer instar y

la unidad experimental para los bioensayos en *P. xyllostela* consistió en una caja cell-well de 24 pozos con 24 larvas de tercer instar, los bioensayos se realizaron por triplicado y la mortalidad de las larvas se monitoreó a los siete y 14 días.

Se observó que a los siete días, algunas variantes causaron baja toxicidad mostrando porcentajes de mortalidad por debajo del 40%. Sin embargo, el 60% de las larvas que aún estaban vivas, se veían severamente afectadas presentando cambios en la coloración de la piel y en el peso, en comparación con las larvas que fueron expuestas al agua o a la toxina Cyt1A silvestre (Anexo 1). Las larvas de *M. sexta* que fueron expuestas a las variantes de la toxina Cyt1Aa [CytA3-Asa(n), CytA2-Asa(n)] mostraron una disminución en su peso con un promedio de entre 4 y 5 mg, en comparación con los controles (Agua y Cyt1A silvestre) en donde los valores se encuentran por arriba de los 12 mg (Diferencias estadística con Tukey a un nivel de significancia de 0.05). Sin embargo, después de 14 días de haber sido expuestas a las variantes de la toxina Cyt1Aa [CytA3-Asa(n)], la mortalidad fue evidente obteniendo porcentajes de mortalidad por arriba del 45% tanto en *M. sexta* como en *P. xyllostela* (Figura 15A), resultados similares se observaron para las variantes con la inserción del asa 2 [CytA2-Asa(n)] en donde se obtuvieron porcentajes de mortalidad por arriba del 50% (Figura 15B). El análisis de ANOVA de los datos de mortalidad para las variantes de la toxina Cyt1Aa [CytA3-Asa(n), CytA2-Asa(n)], indica que las variantes CytA3-Asa6, CytA3-Asa7, CytA3-Asa9, CytA2-Asa6, CytA2-Asa7 y CytA2-Asa9 muestran diferencias significativas ($P < 0.0001$) en comparación con el resto de las variantes y los controles del agua y la toxina Cyt1Aa silvestre.

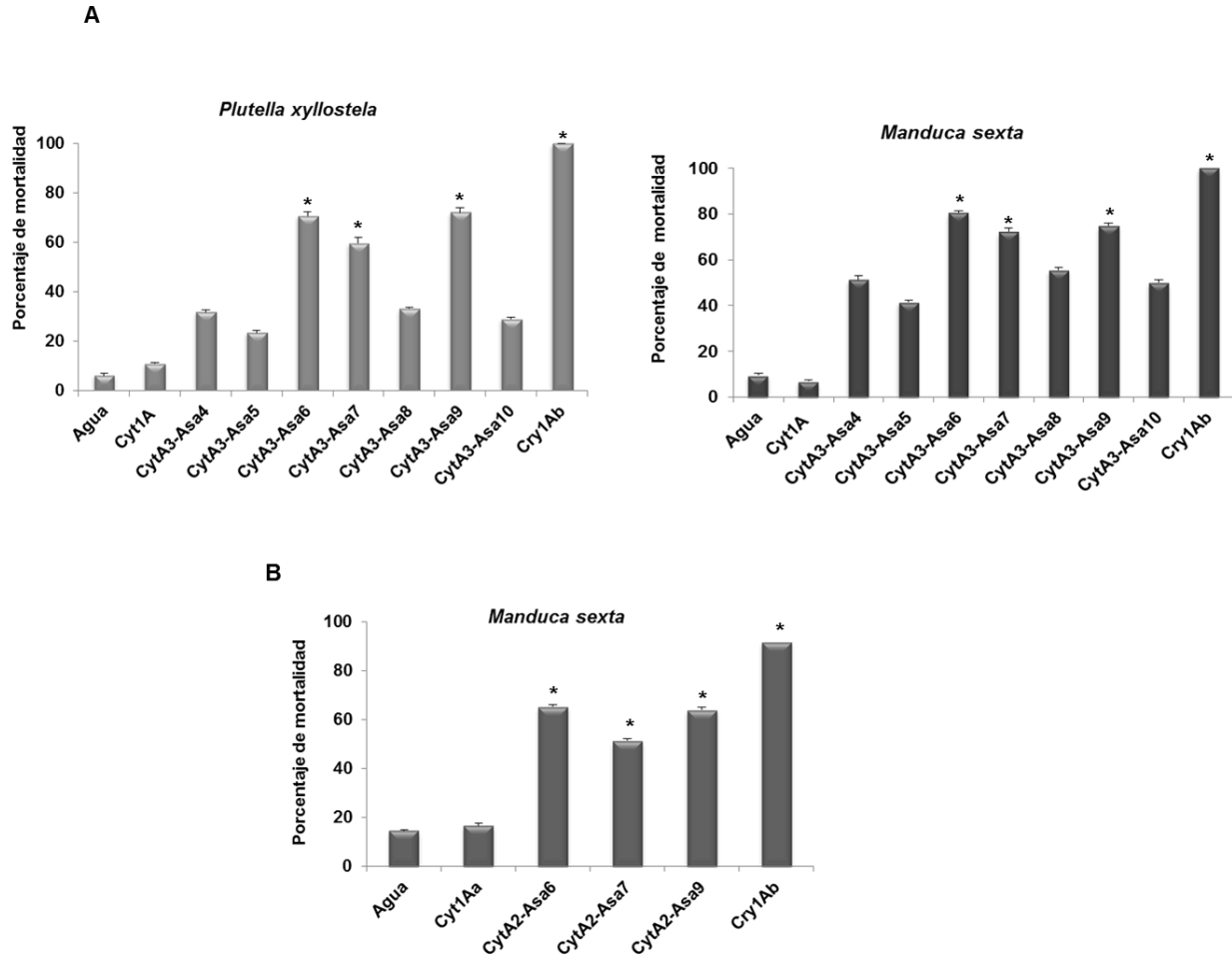


Figura 15. Porcentaje de mortalidad en larvas de *M. sexta* y *P. xylostella* al ser expuestas a las variantes de la toxina Cyt1Aa que contienen el asa 2 o asa 3 de Cry1Ab en las distintas asas de la toxina Cyt1Aa. **A)** Mortalidad causada por las variantes de la toxina Cyt1Aa con la inserción del asa 3 de Cry1Ab. (CytA3-Asa4) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 4; (CytA3-Asa5) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 5; (CytA3-Asa6) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 6; (CytA3-Asa7) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 7; (CytA3-Asa8) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 8; (CytA3-Asa9) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 9; (CytA3-Asa10) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 10. **B)** Mortalidad causada por las variantes de la toxina Cyt1Aa con la inserción del asa 2 de Cry1Ab. (CytA2-Asa6) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 6; (CytA2-Asa7) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 7; (CytA2-Asa9) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 9. Los * denotan diferencias estadísticas a un nivel de significancia del 0.05 con la prueba de Tukey.

Con base en los resultados obtenidos en los dos bioensayos, se puede observar que los porcentajes de mortalidad en *P. xylostella* causados por las variantes CytA3-Asa6 (71%), CytA3-Asa7 (60%) y CytA3-Asa9 (73%), son muy similares a los que se obtuvieron en las larvas de *M. sexta*, CytA3-Asa6 (81%), CytA3-Asa7 (72%) y CytA3-Asa9 (75%), lo cual nos sugiere que estas tres

variantes podrían tener el potencial para inducir un efecto tóxico en larvas de lepidópteros. En el anexo 2 se pueden observar los efectos en las larvas de *M. sexta* a los 14 días después de ser expuestas a las toxinas

7.5.2. Toxicidad en larvas de *A. aegypti*.

Para evaluar si las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab [CytA3-Asa(n), CytA2-Asa(n)] siguen conservando su actividad tóxica en larvas de mosquitos de *A. aegypti*, se realizaron bioensayos utilizando cinco concentraciones (1000, 1500, 2000, 5000 y 10000 ng/ml) de complejo espora-cristal y proteína soluble. Para los bioensayos con el complejo espora-cristal cada unidad experimental consistió en 10 larvas de tercer instar en 10 ml de agua y para los bioensayos con la proteína soluble consistió en 10 larvas de primer instar en 1 ml de agua, como control positivo se utilizó la toxina Cyt1Aa silvestre y como control negativo agua. Los bioensayos se realizaron por triplicado con un total de nueve repeticiones para cada una de las variantes, la mortalidad se registró a las 24 h.

Con base a los resultados obtenidos en los bioensayos con el complejo espora-cristal y proteína soluble, se observó que las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen el asa 2 o 3 de Cry1Ab, no mostraron actividad tóxica sobre las larvas de mosquito de *A. aegypti* (Tabla 6). Quizás la inserción de estas asas de Cry1Ab, estén impidiendo que la toxina pueda establecerse en las BBM apicales de los intestinos del mosquito y en consecuencia quizás la toxina ya no es capaz de formar poros o de romper la membrana en complejos tipo micela de lípidos-proteínas y por lo consiguiente no se observa un efecto tóxico. Cabe mencionar que en los bioensayos con proteína soluble, la toxina Cyt1Aa silvestre también perdió su actividad tóxica sobre las larvas de mosquito aun en la concentración de 10000 ng/ml.

Tabla 6. Porcentaje de mortalidad de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab en larvas de *A. aegypti* a las 24 h.

Concentración Toxina	1000 ng/ml		1500 ng/ml		2000 ng/ml		5000 ng/ml		10000 ng/ml	
	Espora Cristal	Proteína soluble	Espora Cristal	Proteína soluble	Espora Cristal	Proteína soluble	Espora Cristal	Proteína soluble	Espora Cristal	Proteína soluble
Agua	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CytA3-Asa4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CytA3-Asa5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CytA3-Asa6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CytA3-Asa7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CytA3-Asa8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CytA3-Asa9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CytA3-Asa10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cyt1Aa WT	60	0	100	0	100	0	100	0	100	0
CytA2-Asa6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CytA2-Asa7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CytA2-Asa9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

7.6. Efecto sinérgico de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab en larvas de *A. aegypti*.

Por otro lado fue importante determinar si las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o asa 3 de Cry1Ab siguen siendo capaces de potenciar la actividad de la toxina Cry11Aa en larvas de *A. aegypti*. El análisis de este efecto de potenciación de actividad insecticida de estas variantes se realizó mediante bioensayos, con el complejo espora-cristal de cada una de las variantes mezcladas con el complejo espora-cristal de la toxina Cry11Aa silvestre, como control positivo se utilizó la mezcla de las toxinas Cry11Aa silvestre y Cyt1Aa silvestre y como control negativo agua. Para la toxina Cry11Aa se utilizó una concentración de proteína que matara el 20% de la población de larvas y para la toxina Cyt1Aa una concentración de proteína que matara el 10% de la población de larvas, la unidad experimental consistió en 10 larvas de tercer instar en 10 ml de agua. Los bioensayos se realizaron por triplicado y la mortalidad se registró a las 24 h.

En la Figura 16 se muestran los porcentajes de mortalidad que se obtuvieron al realizar las mezclas de la toxina Cry11Aa silvestre con cada una de las variantes de la toxina Cyt1Aa [CytA3-Asa(n), CytA2-Asa(n)] y la toxina Cyt1Aa silvestre. Se puede observar que las variantes de la toxina Cyt1A que tienen la inserción de las asas 3 y 2 de Cry1Ab, son capaces de incrementar aproximadamente de tres a cuatro veces la actividad tóxica de la toxina Cry11Aa en larvas de *A. aegypti*, comparado con la toxina Cyt1Aa silvestre (ANOVA $P < 0.0030$). En donde las variantes CytA3-Asa(n) mostraron porcentajes de mortalidad entre el 70% y 90%, y las variantes CytA2-Asa(n) valores entre el 50% y 70% de mortalidad, mostrando claramente que las variantes [CytA3-Asa(n), CytA2-Asa(n)] son capaces de potenciar la actividad de la toxina Cry11Aa.

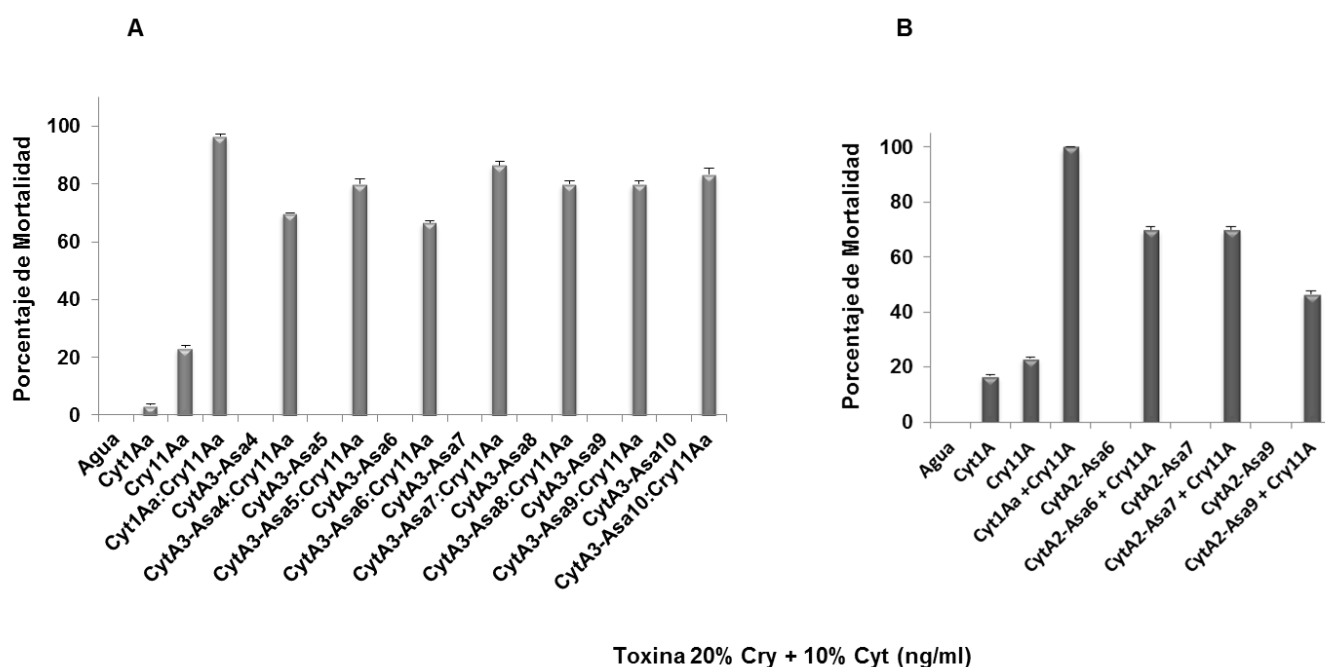


Figura 16. Porcentaje de mortalidad de la mezcla de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o asa 3 de Cry1Ab con la toxina Cry11Aa WT. **A)** Mortalidad causada por las variantes de la toxina Cyt1Aa con la inserción del asa 3 de Cry1Ab. (CytA3-Asa4) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 4; (CytA3-Asa5) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 5; (CytA3-Asa6) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 6; (CytA3-Asa7) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 7; (CytA3-Asa8) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 8; (CytA3-Asa9) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 9; (CytA3-Asa10) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 10. **B)** Mortalidad causada por las variantes de la toxina Cyt1Aa con la inserción del asa 2 de Cry1Ab. (CytA2-Asa6) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 6; (CytA2-Asa7) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 7; (CytA2-Asa9) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 9.

Dado que las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab [CytA3-Asa(n), CytA2-Asa(n)], que se generaron en este proyecto no son tóxicas contra *A. aegypti*, no se puede calcular el factor de sinergismo entre estas proteínas utilizando la fórmula de Tabashnik (ver metodología). Sin embargo, se puede determinar la mortalidad teórica que se obtendría al mezclar cada una de las variantes con la toxina Cry11A y comparar este valor con la mortalidad experimental como se reportó anteriormente por Fernández-Luna y colaboradores (2010).

Se observó que la mortalidad teórica esperada para cada una de las variantes con la mezcla de la toxina Cry11Aa fue del 24%. Sin embargo, cuando se calculó la mortalidad experimental de la mezcla de cada una de las variantes con la toxina Cry11A, ésta resultó ser de tres a cuatro veces más tóxica ($P < 0.0030$) (Tabla 7). Por lo que se concluye que las variantes generadas en este trabajo son capaces de potenciar la actividad tóxica de la toxina Cry11Aa, independientemente de su actividad insecticida.

Tabla 7. Sinergismo entre las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab con la toxina Cry11A en larvas de *A. aegypti*.

Toxina/Mutante	$S_{(toxina)OBS}^a = (R1+R2+R3)/n$	$S_{(mez)EXP}^b = S_{(Cyt1Aa)OBS} \times S_{(Cry11Aa)OBS}$	Mortalidad teórica ^c = $(1-S_{(mez)EXP}) \times 100\%$	Mortalidad experimental ^d
Cyt1Aa	1	0.76	24%	100% ± 0.6
CytA3-Asa4:Cry11Aa	1	0.76	24%	70% ± 0
CytA3-Asa5:Cry11Aa	1	0.76	24%	80% ± 1.7
CytA3-Asa6:Cry11Aa	1	0.76	24%	67% ± 0.6
CytA3-Asa7:Cry11Aa	1	0.76	24%	87% ± 1.2
CytA3-Asa8:Cry11Aa	1	0.76	24%	80% ± 1.0
CytA3-Asa9:Cry11Aa	1	0.76	24%	80% ± 1.0
CytA3-Asa10:Cry11Aa	1	0.76	24%	83% ± 2.1
Cry11Aa	0.76			
CytA2-Asa6:Cry11Aa	1	0.76	24%	70% ± 1.0
CytA2-Asa7:Cry11Aa	1	0.76	24%	70% ± 1.1
CytA2-Asa9:Cry11Aa	1	0.76	24%	47% ± 0.8

^a, sobrevivencia observada con cada una de las toxinas; $S_{(toxina)OBS}$ corresponde a la proporción de larvas que sobrevivieron a la exposición de la toxina.

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

^c, Mortalidad teórica esperada para la mezcla de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen las asas 2 o 3 de Cry1Ab con la toxina Cry11Aa se calculó con la fórmula $(1 - S_{(Cyt1Aa, Cry11Aa)EXP}) \times 100\%$.

^d, Mortalidad experimental obtenida en los bioensayos. Cry11Aa (108 ng/ml); Cyt1Aa y variantes de la toxina Cyt1Aa (30 ng/ml).

7.7. Actividad hemolítica de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab.

Para evaluar si las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab en las distintas asas de la toxina Cyt1Aa siguen conservando su actividad hemolítica, se realizaron ensayos de hemólisis utilizando eritrocitos de conejo los cuales se incubaron con diferentes concentraciones de toxina (125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 y 80000 ng/ml). Para los ensayos se utilizaron 20 µl de eritrocitos previamente calibrados en 180 µl de mezcla toxina/solución Alsever's (solución anticoagulante) y el volumen final fue colocado en una placa de 96 pozos con fondo plano. La placa se incubó durante 30 min, se centrifugó y el sobrenadante se recuperó y se colocó en una placa nueva. El porcentaje de hemólisis se determinó midiendo la absorbancia en un lector de ELISA a 405 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado con un total de nueve repeticiones para cada una de las variantes.

En la Figura 17 se puede observar que las variantes de las toxinas Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab [CytA3-Asa(n), CytA2-Asa(n)], disminuyeron en 1.5 a 7 veces su actividad hemolítica en comparación con la toxina Cyt1Aa silvestre (ANOVA $P < 0.0001$). Mostrando valores de absorbancia por debajo de 0.6 a un en la concentración de 8 µg/ml. La dosis efectiva 50 (DE₅₀, dosis en la cual el 50% de las células se encuentran lisadas) calculada para la Cyt1Aa silvestre fue de 190 ng/ml (182.4-197.8 ng/mL). Quizás los resultados obtenidos en los ensayos de hemólisis, se deban a que la inserción de las asas 3

y 2 de Cry1Ab están impidiendo que la toxina pueda establecerse en las membranas de los eritrocitos y en consecuencia la toxina ya no es capaz de formar poros o de lisar la membrana.

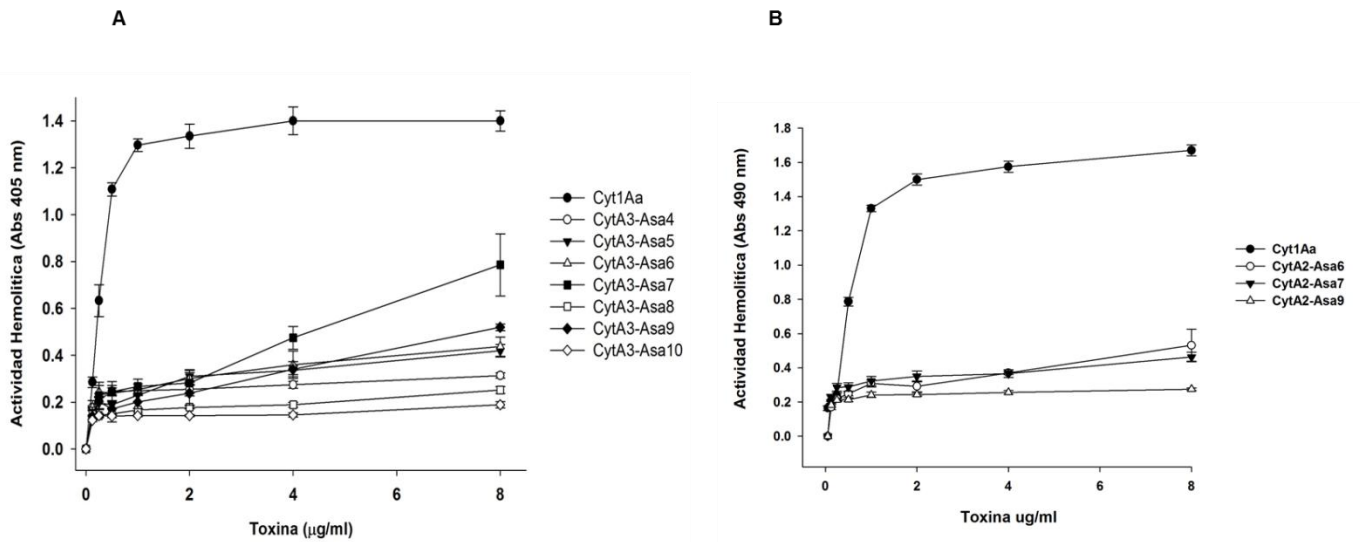


Figura 17. Actividad hemolítica de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o asa 3 de Cry1Ab en eritrocitos de conejo. **A)** Actividad hemolítica de las variantes con el asa 3. Cyt1Aa silvestre, círculos negros; (Cyt1A3-Asa4) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 4, círculos blancos; (Cyt1A3-Asa5) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 5, triángulos negros; (Cyt1A3-Asa6) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 6, triángulos blancos; (Cyt1A3-Asa7) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 7, cuadrados negros; (Cyt1A3-Asa8) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 8, cuadrados blancos; (Cyt1A3-Asa9) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 9, rombos negros; (Cyt1A3-Asa10) Cyt1Aa + Asa 3 de Cry1Ab en el asa 10, rombos blancos. **B)** Actividad hemolítica de las variantes con el asa 2. Cyt1Aa silvestre, círculos negros; (Cyt1A2-Asa6) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 6, círculos blancos; (Cyt1A2-Asa7) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 7, triángulos negros; (Cyt1A2-Asa9) Cyt1Aa + Asa 2 de Cry1Ab en el asa 9, triángulos blancos; Las líneas en las barras corresponden al error estándar.

8. DISCUSIÓN.

Las toxinas Cyt y Cry de Bt han sido utilizadas por décadas para el control de insectos que causan daños tanto en la agricultura como en el sector de salud pública (Guerchicoff, *et al.*, 2001; Schnepf, *et al.*, 1998). La interacción específica que muestra este grupo de toxinas en el intestino medio de distintas especies de insectos, las coloca como una alternativa para el control de plagas. Aunado a ello, hasta el momento no se ha reportado que causen efectos adversos en especies de insectos que son considerados benéficos para los ecosistemas, una preocupación que permanece con los insecticidas químicos desde su aplicación (Glare, *et al.*, 2012). A pesar de que Bt ha resultado ser un agente de control muy efectivo, algunas especies de lepidópteros ya han generado resistencia a algunas toxinas Cry; lo que ha llevado a la implementación de nuevas estrategias para tratar de contrarrestar la resistencia que han desarrollado este grupo de insectos (Pardo-López, *et al.*, 2009).

En este contexto, las toxinas Cyt son proteínas que representan una herramienta con gran potencial biotecnológico. En particular este grupo de toxinas poseen características especiales e interesantes, debido a que solo son tóxicas para insectos dípteros y además promueven la potenciación de la actividad insecticida de otras toxinas de Bt como son las toxinas Cry4A y Cry11A (Activas contra dípteros) (Porter, *et al.*, 1993). En particular la toxina Cyt1Aa no muestra ningún efecto tóxico en larvas de insectos pertenecientes al orden Lepidoptera y no es capaz de synergizar o potenciar la toxicidad de las toxinas Cry activas contra especies de lepidópteros como la toxina Cry1Ab (Pérez, *et al.*, 2005).

Por otro lado, Sayyed y colaboradores (2001), reportan que la toxina Cyt1Aa es capaz de potenciar la actividad tóxica de Cry1Ac en colonias resistentes de *P. xylostella*. Sin embargo, Meyer y colaboradores (2001) reportan que la toxina Cyt1Aa no potencia la actividad tóxica de esta toxina en colonias de *P. xylostella* y *Pectinophora gossypiella*. Es importante resaltar que quizás estas variaciones en los resultados, estén relacionadas con la manera en la que se llevan a cabo los ensayos de toxicidad, por ejemplo, Sayyed y colaboradores

evaluaron las toxinas de manera activada, en contraste, Meyer utilizó el complejo espora-cristal de cada una de ellas para realizar los ensayos de toxicidad, lo cual podría estar relacionado con un aumento o disminución de la actividad tóxica en las especies de lepidópteros. Cabe mencionar que no todas las poblaciones de insectos presentan la misma susceptibilidad a la aplicación de las toxinas, por lo que sería interesante analizar si la combinación de estas toxinas podría favorecer un incremento en la toxicidad en otras especies de lepidópteros.

Por otro lado, Fernández y colaboradores (2010), observaron que la unión de la toxina Cyt1Aa en las microvellosidades (BBM) apicales del intestino medio de *M. sexta* fue menor del 50%, en comparación con la unión a las BBM de *A. aegypti*, en donde se obtuvieron valores por arriba del 90%, apoyando que la toxina Cyt1Aa no es tóxica para *M. sexta*, los resultados anteriores quizás se deban a que en el intestino del lepidóptero existe un número reducido de sitios de unión para la toxina Cyt1Aa. Por otro lado, Cantón y colaboradores (2014) mostraron que la unión de la toxina Cyt1Aa está disminuida a las BBM de *M. sexta*, sin embargo, esta toxina es capaz de formar oligómeros en presencia de estas BBM, pero no es tóxica para este lepidóptero. Con base en ensayos de competencia, observaron que la retención de la toxina Cyt1Aa a las BBM de *M. sexta* es mucho menor comparado con la retención de esta toxina a las BBM de *A. aegypti*, en este sentido, quizás el oligómero no es capaz de establecerse de manera eficiente en las BBM de *M. sexta* y en consecuencia no es capaz de insertarse en la membrana y formar poros, correlacionando con una pérdida de la toxicidad en este lepidóptero.

Cabe mencionar, que la toxicidad de Cyt1Aa es baja para *A. aegypti*, comparada con las toxinas Cry activas contra mosquitos como Cry11a, Cry4Aa y Cry4Ba (Ben-Dove, 2014), lo que da la pauta para pensar que la principal función de la toxina Cyt1Aa podría ser la de potenciar la actividad tóxica de las toxinas Cry en este grupo de insectos (Pérez, *et al.*, 2007). En un trabajo previo, se observó que la toxina Cyt1Aa no es tóxica para *A. albimanus*, sin embargo, es capaz de potenciar la actividad tóxica de las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa en esta especie de

mosquito (Fernández-Luna., *et al.*, 2010). En el presente trabajo se llevó a cabo la construcción de variantes de la toxina Cyt1Aa que tuvieran la inserción del asa 2 o asa 3 (Dominio II) de Cry1Ab en diferentes regiones de la toxina Cyt1Aa, con la finalidad de conferir la capacidad de unión de esta toxina a los receptores APN, ALP y CDR de *M. sexta* y de esta manera generar toxinas Cyt1Aa que pudieran mostrar actividad tóxica hacia insectos del orden Lepidoptera. El asa 3 es importante para la unión de Cry1Ab con CDR, ALP y APN como monómero y el asa 2 es importante en la interacción con cadherina como monómero y con ALP y APN como oligómero (Gómez et al., 2003 y 2006; Arenas et al., 2010; Pacheco et al., 2010).

En este trabajo se llevó a cabo la construcción de diez variantes con la inserción del asa 3 de Cry1Ab (CytA3-Asa1, CytA3-Asa2, CytA3-Asa3, CytA3-Asa4, CytA3-Asa5, CytA3-Asa6, CytA3-Asa7, CytA3-Asa8, CytA3-Asa9 y CytA3-Asa10) y tres variante con la inserción del asa 2 de Cry1Ab (CytA2-Asa6, CytA2-Asa7 y CytA2-Asa9). Cuando se llevó a cabo la expresión de estas toxinas en Bt, se observó que las variantes CytA3-Asa1, CytA3-Asa2 y CytA3-Asa3 no fueron estables, sin embargo, los cristales de las otras 7 variantes son semejantes a los cristales formados por la toxina Cyt1Aa silvestre, resultados similares se obtuvieron para las variantes con la inserción del asa 2. Lo anterior sugiere que la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab no estarían induciendo cambios considerables en la toxina, permitiendo que estas variantes de la toxina Cyt1Aa sean capaces de plegarse, agruparse y formar cristales estables. Sin embargo, es necesario realizar análisis más detallados como ensayos de dinámica molecular (DM), dicroísmo circular (DC) o espectroscopia infrarroja (FTIR de sus siglas en ingles Fourier-transform infrared spectroscopy) que nos permitan obtener información más precisa de cómo se estaría afectando la estructura de la toxina Cyt1Aa con la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab.

Un paso determinante dentro del mecanismo de acción de este grupo de toxinas, es la solubilización de los cristales en el intestino del insecto debido a las condiciones alcalinas y reductoras que se presentan dentro de éste (Schnepf, *et al.*, 1998). El proceso de solubilización permite la disgregación de éstos y en consecuencia la liberación de las protoxinas, paso indispensable para que estas puedan actuar contra su blanco (Pardo-López, *et al.*, 2013). Se sabe que la solubilidad de las proteínas está dada en función de los factores físico-químicos propios de cada polímero (Peso molecular, estructura conformacional, composición de aminoácidos, ionización, pH, temperatura) (Phizicky y Fields, 1995). Estudios previos han demostrado que algunas toxinas Cry se solubilizan en soluciones amortiguadoras de carbonatos y algunas otras en hidróxido de sodio, en conjunto con agentes reductores (Lee, *et al.*, 1992; Bravo, *et al.*, 2004). La solubilización de la toxina Cyt1Aa de manera *in vitro*, se lleva a cabo principalmente en solución de carbonatos pH 10 (Cohen, *et al.*, 2011). Sin embargo, al llevar a cabo las pruebas de solubilización de las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3, se observó que este proceso ocurrió en la solución de hidróxido de sodio, por otro lado, también se observó que estas variantes se pueden solubilizar en solución de carbonatos, sin embargo, la eficiencia de este proceso fue mucho menor (datos no mostrados). Estos resultados indican que la inserción del asa 2 o 3 quizás están confiriendo nuevas propiedades a la toxina comparadas con aquellas que presenta la toxina Cyt1Aa silvestre. Se podría especular que la inserción de estas asas, podría estar favoreciendo a que las interacciones entre las protoxinas que conforman los cuerpos cristalinos sean mucho más estables y en consecuencia el proceso de disgregación de estos, requiera de algún agente de solubilización más alcalino, en donde un pH mayor a 10 quizás este favoreciendo el proceso de solubilización.

El pH del intestino de lepidópteros y dípteros varía entre un rango de 7 a 12, aunque en otros insectos como los coleópteros el pH es ligeramente ácido (Dow, 1992; Souza-Neto, *et al.*, 2003) La similitud en los ambientes intestinales que presentan estos grupos de insectos, permite suponer que las variantes generadas en este trabajo podrían disociarse a protoxinas monoméricas, en los intestinos de

diferentes especies de lepidópteros y de esta manera poder interactuar con los distintos receptores que se encuentran presentes en las BBM apicales del intestino medio. Cabe resaltar, que en las pruebas de solubilización se trata de simular las condiciones que se pudieran estar dando en la región intestinal. Se propone que la pérdida de los extremos N y C terminal de la proteína Cyt1Aa son esenciales para que esta pueda establecerse en la membrana de las células del intestino medio y llevar a cabo la lisis celular (Cohen, *et al.*, 2011). En este trabajo se observó que las variantes de la toxina Cyt1Aa [CytA3-Asa(n), CytA2-Asa(n)], son estables al procesamiento proteolítico con tripsina, dando como resultado un fragmento de aproximadamente 24 kDa, lo que nos sugiere que las variantes generadas en este proyecto se procesan de manera similar a la toxina Cyt1Aa silvestre. Cantón y colaboradores (2014) mostraron que la toxina Cyt1Aa silvestre es capaz de procesarse en el jugo gástrico de *M. sexta*, lo que nos permite inferir que las variantes generadas en este trabajo se pueden solubilizar y activar adecuadamente en el intestino de insectos lepidópteros.

La unión de las toxinas a la membrana de las células del intestino medio es un paso determinante para la toxicidad, hasta el momento no existe evidencia experimental de que la interacción de la toxina Cyt1Aa dependa de un receptor de carácter proteico (Cohen, *et al.*, 2011). Sin embargo, se ha reportado que la unión de esta toxina a las membranas esta mediada principalmente por lípidos (Thomas y Ellar, 1983a). El principal objetivo de este proyecto fue generar variantes de la toxina Cyt1Aa que fueran capaces de unirse a receptores proteínicos como son APN, ALP y CDR, con la finalidad de ampliar su rango de acción en otros insectos no blanco.

Las variantes de la toxina Cyt1Aa con la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab en las asas 6, 7 y 9 de la toxina Cyt1Aa (CytA3-Asa6, CytA3-Asa7, CytA3-Asa9, CytA2-Asa6, CytA2-Asa7, CytA2-Asa9) mostraron una unión significativa a los receptores APN, ALP y CDR; incrementando su unión de 2 a 7 veces al receptor APN, de 2 a 4 veces al receptor ALP y de 1,5 a 4 veces al receptor CDR, en comparación con la toxina Cyt1Aa silvestre la cual no mostró una unión

significativa a ninguno de los tres receptores. Interesantemente, cuando se llevaron a cabo los ensayos de toxicidad con las diez variantes en larvas de *M. sexta* y *P. xylostella*, se observó que aquellas variantes que mostraron una unión significativa a los receptores, también fueron las que resultaron ser más tóxicas para estas dos especies de lepidópteros. Estos datos sugieren que la inserción del asa 2 o el asa 3 de Cry1Ab, en diferentes localizaciones de la toxina Cyt1Aa podrían estar aumentando la unión de esta toxina en distintos sitios de las BBM in vivo, favoreciendo una interacción simultánea de esta toxina a los receptores proteicos. Dado lo anterior, en un futuro podría ser interesante realizar ensayos de unión a las BBM de este lepidóptero o marcar a las variantes de la toxina Cyt1Aa [CytA3-Asa(n), CytA2-Asa(n)] con algún fluoróforo, con la finalidad de elucidar como se podrían estar distribuyendo estas toxinas en el intestino de *M. sexta*.

Se pudo observar que las variantes [CytA3-Asa(n), CytA2-Asa(n)] generadas en este trabajo causan baja toxicidad en comparación con la toxina Cry1A, cuya mortalidad en bioensayos se observa después de los 7 días; cabe resaltar que las larvas que aún estaban vivas se veían severamente afectadas, presentando cambio en la coloración de la piel y una reducción en el peso comparadas con las larvas que fueron expuestas al agua y a la toxina Cyt1A silvestre. Sin embargo, después de 14 días de haber sido expuestas a las variantes de la toxinas Cyt1Aa, la mortalidad fue evidente tanto en *M. sexta* como en *P. xylostella*, resultados similares se observaron para las variantes con la inserción del asa 2 en larvas de *M. sexta*. En este contexto, los insectos enfermos exhiben características o disfunciones que son designadas como signos (cambios físicos: cambios de color, malformaciones en el cuerpo, fragilidad del tegumento, etc.) y síntomas (comportamiento anormal: movimientos irregulares, cese de alimentación, vómito, diarrea, etc.) (Kaya y Vega, 2012). Con base a lo anterior, en algunos reportes se hace mención de que insectos infectados por Bt y *B. cereus*, tienden a dejar de alimentarse, presentan diarrea y la coloración de su cuerpo tiende a cambiar (Schnepf, *et al.*, 1998).

Una vez que el patógeno ha entrado y se ha establecido en el hospedero, este comienza a mostrar una serie de síntomas externos a causa de la infección, los cuales pueden variar dependiendo del grado de la infección y el tipo de patógeno. El cese de la alimentación, parálisis, diarrea o vómito son síntomas que indican que el patógeno ha logrado establecerse en el hospedero, y en consecuencia hay una activación de la respuesta inmune, promoviendo la generación de hemocitos (células responsables de la respuesta inmune en insectos) para tratar de contener la infección (Adamo, *et al.*, 2010). Una de las principales barreras de defensa contra patógenos es la matriz peritrófica, está delgada capa de quitina protege la zona epitelial del contacto con microbios o agentes abrasivos (Brandt, *et al.*, 1978; Barbehenn, 2001). Para tratar de evadir esta barrera, la mayoría de las bacterias entomopatógenas secretan quitinasas durante el proceso de infección, estas enzimas promueven la degradación de la matriz peritrófica y en consecuencia, permite que la bacteria entre y se establezca en el hemocele, provocando una septicemia la cual ocasiona cambios en la flacidez y coloración del hospedero (Wiwat, *et al.*, 2000; Thamthiankul, *et al.*, 2001). En este trabajo, los ensayos de toxicidad se llevaron a cabo con el complejo espora-cristal de cada una de las variantes de la toxina Cyt1Aa, quizás en este complejo aún hay remanentes de algunas enzimas, que pudieran estar favoreciendo la disrupción de la matriz peritrófica permitiendo la entrada de las esporas al hemocele y dando como resultado un incremento de la población bacteriana, lo cual conlleva a una infección severa y finalmente a la muerte de las larvas.

Por otro lado, los resultados obtenidos en los bioensayos sugieren que quizás las variantes de la toxina Cyt1Aa [CytA3-Asa(n), CytA2-Asa(n)] generadas en este trabajo, podrían tener un modo de acción diferente al de las toxinas Cry, posiblemente estas toxinas estén desencadenando alguna vía de señalización intracelular durante la intoxicación de las larvas. De manera general el mecanismo de acción de las toxinas Cry, propone que estas toxinas inducen la muerte celular formando poros en las células epiteliales del intestino medio (Bravo, *et al.*, 2007). Sin embargo, un modelo alternativo propone que la muerte del insecto se debe a

la activación de una cascada de señalizaciones dependiente de Mg^{2+} lo que conllevan a la muerte celular; se propone que la interacción de la toxina Cry1Ab con el receptor CDR, provoca la activación de la proteína G y de la proteína adenil ciclasa (AC), lo cual promueve un incremento en las concentraciones de AMP cíclico (cAMP) y en consecuencia se lleve a cabo la activación de la proteína quinasa A (PKA) provocando la desestabilización del citoesqueleto y de los canales iónicos (Zhang, et al., 2006).

En otro contexto, Chougule y colaboradores (2013) mostraron que la inserción del péptido GBP3 en diferentes regiones de la toxina Cyt2Aa, resulta en proteínas que son capaces de matar a dos especies diferentes de áfidos. Ellos muestran que la inserción del péptido GBP3 en las asas 1, 3 y 4 de la toxina Cyt2Aa aumentaron la actividad tóxica en los áfidos *M. persicae* y *A. pisum*, además de que estas variantes conservaron su actividad insecticida contra larvas de *A. aegypti*. Cabe mencionar que las toxinas Cyt1Aa y Cyt2Aa comparten un 35% de identidad. Sin embargo, sus estructuras tridimensionales son muy similares. Interesantemente, la región de la toxina Cyt1Aa en donde se localizan las asas 1 y 2, es muy flexible (Cohen, *et al.*, 2011), lo que podría correlacionar con el hecho de que las variantes generadas CytA3-Asa1, CytA3-Asa2 y CytA3-Asa3, resultaran en proteínas inestables. Con base en la sobreposición de las estructuras tridimensionales de las toxinas Cyt1Aa y Cyt2Aa, las asas 3 y 4 de la toxina Cyt2Aa son homologas a las asas 6 y 9 de la toxina Cyt1Aa. Interesantemente, nuestros datos también indicaron que las variantes de la toxina Cyt1Aa con la inserción del asa 3 y asa 2 en las asas 6 y 9 de la toxina Cyt1Aa dan como resultado una unión significativa a los receptores y además resulta en proteínas que muestran una actividad insecticida sustancial contra los lepidópteros *M. sexta* y *P. xylostella*. De igual manera, las variantes en el asa 7 de la toxina Cyt1Aa fueron capaces de unirse a los receptores y aumentaron la toxicidad contra estas dos especies de lepidópteros. Cabe resaltar que esta asa no fue seleccionada por Chougule y colaboradores (2013). Algo interesante de mencionar, es que las asas que resultaron con una unión significativa a los receptores y que indujeron actividad tóxica, se localizan en la misma cara de la

toxina Cyt1Aa, lo que sugiere que este lado de la toxina podría ser un sitio potencial para inducir la unión de esta toxina a otras proteínas presentes en las BBM en otros grupos de insectos. En la figura 18 se muestra la estructura tridimensional de la toxina Cyt1Aa (PDB 3RON) en donde se puede observar que las asas 6, 7 y 9 (marcadas en rojo) de la toxina Cyt1Aa, que mostraron una unión significativa a los receptores ALP, APN y CDR, así como un incremento en la toxicidad en larvas de lepidópteros, se encuentran localizadas en la misma cara de la toxina.

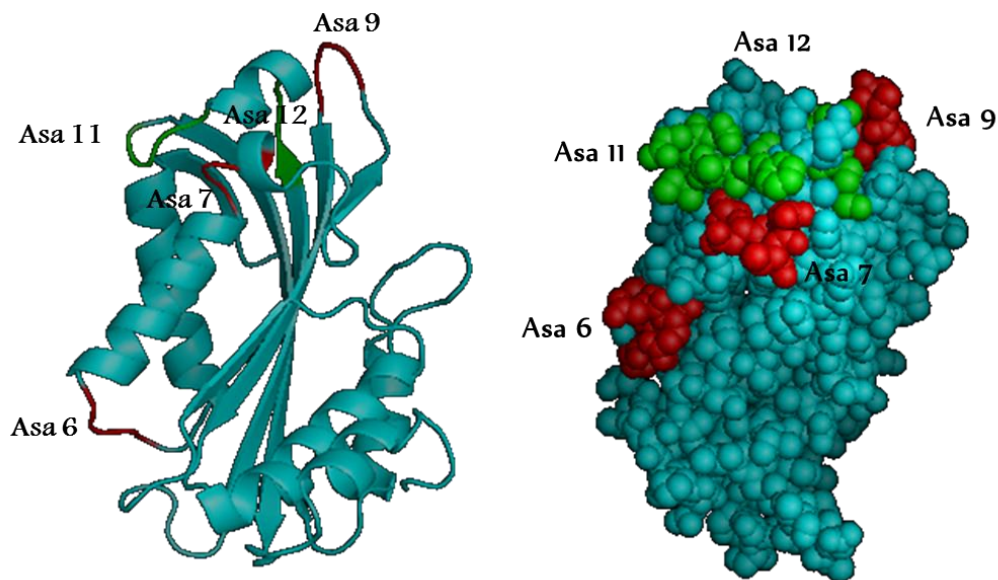


Figura 18. Estructura tridimensional de la toxina Cyt1Aa (PDB 3RON). En rojo se muestran las asas de la toxina que mostraron una unión significativa a los receptores ALP, APN y CDR, así como un incremento en la toxicidad en larvas de lepidópteros. En verde se muestran las asas que están reportadas en la interacción con las toxinas Cry11 y Cry4. Los archivos en PDB se obtuvieron del banco de datos de proteínas <https://www.rcsb.org>.

Cabe mencionar que las variantes de la toxina Cyt1Aa generadas en este trabajo, resultaron en toxinas que no fueron tóxicas para larvas de *A. aegypti*, este resultado se observó tanto en espora-cristal como en proteína soluble, en contraste las variantes de la toxina Cyt2Aa mantuvieron su actividad tóxica aun

cuando se analizaron como proteínas solubles. En el caso de la toxina Cyt1Aa silvestre también perdió su actividad tóxica cuando se evaluó como proteína soluble. Esta discrepancia en los resultados, pudiera estar relacionada con la susceptibilidad de las poblaciones de mosquitos a la toxina, la manera en la que se llevaron a cabo los bioensayos, el sistema de expresión de la proteína y en qué organismo se está expresando la toxina. Por otro lado, las hélices alfa-A y alfa-C de la toxina Cyt1A y Cyt2A son elementos importantes a nivel estructural y en eventos relacionados con la interacción a la membrana y en el ensamblaje intermolecular de la toxina para formar poros (Gazit, *et al.*, 1997; Suktham, *et al.*, 2013), por lo que quizás la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab en la toxina Cyt1Aa esté impidiendo que la toxina pueda interactuar con la membrana a través de estas hélices o que se estén afectando las interacciones entre las toxinas lo cual ya no permite que se asocien para llevar a cabo la formación de un oligómero y formar un poro, lo cual podría explicar la pérdida de toxicidad de las variantes generadas en este proyecto en las larvas de *A. aegypti*. El mecanismo de acción de este grupo de toxinas aún sigue siendo un tema de debate; por un lado se propone que después de interactuar con la membrana la toxina forma poros y causa la lisis celular; y en otro sentido se propone que esta toxina se agrega de manera desordenada en la membrana provocando la disrupción de ésta, en complejos tipo micela de proteína-lípido. Sin embargo, las variantes de la toxina Cyt1Aa [CytA3-Asa(n), CytA2-Asa(n)] aún son capaces de sinergizar la actividad tóxica de Cry11Aa. Previamente se había mostrado que la actividad insecticida de Cyt1Aa no es necesaria para inducir sinergismo de Cry11Aa o Cry4Ba, dado que mutantes de Cyt1Aa que se encuentran afectadas en unión, oligomerización y toxicidad, siguen siendo capaces de unir y potenciar la actividad tóxica de la toxina Cry11Aa (López-Díaz, *et al.*, 2013).

La toxina Cyt1Aa exhibe actividad citolítica *in vitro*, sobre una gran variedad de células de mamífero, incluyendo eritrocitos, linfocitos y fibroblastos (Thomas y Ellar, 1983). Cuando se analizó la actividad hemolítica de las variantes de la toxina Cyt1Aa generadas en este proyecto en eritrocitos de conejo, se observó que las variantes de esta toxina disminuyeron su actividad hemolítica en 1.5 a 7 veces

comparado con la toxina Cyt1Aa silvestre, en donde la dosis efectiva 50 (DE₅₀, dosis en la cual el 50% de las células se encuentran lisadas) calculada para esta toxina fue de 190 ng/ml (182.4-197.8 ng/mL). Estudios en eritrocitos y tubos de Malpigio, indican que se requiere la acumulación de los monómeros de la toxina antes de que ésta se una a la membrana y provoque la lisis celular, en donde factores como la temperatura y la fluidez de la membrana también son determinantes para favorecer este efecto (Maddrell, *et al.*, 1988; Promdokoy y Ellar, 2003). En este contexto, quizás la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab estén afectando las cargas adyacentes a las regiones involucradas en la interacción a la membrana o en la asociación de los monómeros y en consecuencia la toxina ya no es capaz de interactuar y lisar a la célula, lo que podría explicar la afectación en la actividad hemolítica en los eritrocitos de conejo. Estudios de lipidómica de eritrocitos, reportan que la membrana de este grupo celular, puede estar constituido por más de 100 diferentes tipos de lípidos, variando entre las distintas especies de mamíferos (Cullis y de Kruijff, 1979; Cullis, *et al.*, 1986), se ha visto que la toxina Cyt1Aa muestra diferencias en la actividad hemolítica sobre eritrocitos de conejo, ratón, camello y caballo (Tomas y Ellar, 1983). Por lo que, sería interesante en un futuro evaluar la actividad hemolítica de estas variantes en eritrocitos de otras especies de mamíferos, con la finalidad de determinar si efectivamente estas variantes están afectadas totalmente en este proceso. Esto sería importante, desde el punto de salud pública, dado que si en un futuro estas variantes pudieran ser comercializadas para su aplicación en cultivos, se podría contar con toxinas que no representen un riesgo a la salud del hombre u otros mamíferos.

En este trabajo, mostramos por primera vez, que el intercambio de regiones involucradas en la especificidad en insectos entre toxinas que no se encuentran relacionadas estructuralmente podría proporcionar una herramienta efectiva para cambiar la especificidad de las toxinas y en un futuro proporcionar herramientas que permitan contrarrestar la resistencia que han generado algunas especies de insectos a las toxinas Cry de Bt. Recientemente una publicación mostró que la fusión de la toxina BinA a la toxina Cyt1A dio como resultando toxinas que

muestran un espectro de toxicidad más amplio contra mosquitos (Bideshi, et al., 2017). Estos datos sugieren que la toxina Cyt1Aa quizás es capaz de aceptar dominios más grandes y resultar en toxinas activas. Lo que en un futuro se podrían construir toxinas que contengan dominios completos de otras toxinas con actividad insecticida como las toxinas Cry, Vip o Bin con la finalidad de incrementar su actividad tóxica y migrar su toxicidad a otros grupos de insectos.

9. CONCLUSIONES

Las toxinas Cry interactúan principalmente con los receptores CDR, ALP y APN, a través de las asas 2 y 3 del Dominio II. Mutaciones en estas asas, resultan en proteínas que incrementan o disminuyen su toxicidad contra insectos específicos, lo cual correlaciona con un incremento o disminución en la unión a los receptores presentes en las BBM de estos insectos. Por otro lado, la modificación de los residuos que conforman estas asas de las toxinas Cry, han generado toxinas que han incrementado su toxicidad o han migrado su actividad a otros insectos no blanco. Cabe mencionar que estas modificaciones se han llevado a cabo principalmente en el grupo de las toxinas de tres dominios (Cry) y no así con tanto énfasis para las toxinas Cyt.

En este trabajo demostramos que la inserción del asa 2 o 3 de la toxina Cry1Ab en las distintas asas de la toxina Cyt1Aa, dio como resultado variantes que mostraron una unión significativa a los receptores APN, ALP y CDR de *M. sexta*, lo cual correlacionó con un incremento en la toxicidad en larvas de dos especies de lepidópteros (*M. sexta* y *P. xylostella*). También se observó que estas variantes de la toxina Cyt1Aa perdieron su actividad tóxica contra larvas de *A. aegypti*, sin embargo, estas variantes aún siguen siendo capaces de potenciar la actividad tóxica de la toxina Cry11A. Por otra parte, al evaluar la actividad hemolítica de las variantes de la toxina Cyt1Aa en eritrocitos de conejo, se observó que esta propiedad disminuyó drásticamente en comparación con la toxina Cyt1Aa silvestre.

En este trabajo demostramos por primera vez, que la toxina Cyt1Aa es capaz de aceptar regiones de otras toxinas que no se encuentran relacionadas filogenéticamente, dando como resultado toxinas Cyt1Aa activas que lograron incrementar su actividad tóxica contra otro grupo de insectos como son los lepidópteros.

10. PERSPECTIVAS.

- ❖ Determinar el mecanismo de acción por el cual las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 2 o 3 de Cry1Ab, causan mortalidad en larvas de lepidópteros, a través de:
 - a) Ensayos de oligomerización y formación de poro en las BBM apicales del intestino medio de lepidópteros, con la finalidad de ver si estas variantes son capaces de oligomerizar e insertarse en la membrana.
 - b) Ensayos de fluorescencia, en donde se marque a las variantes con algún fluoróforo para localizarlas en el intestino de las larvas de *M. sexta* y *P. xylostella*.

- ❖ Investigar si existe la activación de alguna vía de señalización intracelular (por ejemplo apoptosis, autofagia, PKA-AC) que pudiera estar involucrada durante el proceso de infección en las larvas de *M. sexta* y *P. xylostella*, al ser alimentadas con las variantes de la toxina Cyt1Aa.

- ❖ Construir variantes de Cyt1Aa que contengan la inserción de regiones de interacción de distintos receptores, con la finalidad de generar toxinas que puedan funcionar como receptores para las toxinas Cry y con ello poder inducir actividad tóxica en distintos grupos de insectos que han generado resistencia a la aplicación de este grupo de toxinas.

- ❖ Construir variantes de Cyt1Aa que sean capaces de inducir el sinergismo de otras toxinas Cry en insectos lepidópteros o coleópteros.

REFERENCIAS

- Al-yahyaee, S. A. S. y Ellar, D. J. 1995. Maximal toxicity of cloned CytA δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* requires proteolytic processing from both the N- and C-termini. *Microbiol.* 141: 3141-3148.
- Adamo, S. A., Barlett, A., Le, J., Spencer, N. y Sullivan, K. 2010. Illnes induced anorexia may reduce trade-oofs between digesti3n and inmune function. *Anim. Behav.* 79:3-10.
- Agaisse, H. y Lereclus, D. 1995. How Does *Bacillus thuringiensis* Produce So Much Insecticidal Crystal Protein?. *J. Bacteriol.* 177(21):6027-6032.
- Arenas, I., Bravo, A., Sober3n, M. y G3mez, I. 2010. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin. *J. Biol. Chem.* 285:12497-12503.
- Barbehenn, R. V. 2001. Roles of peritrophic membranes in protecting herbivorous insects from ingested plant allelochemicals. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 47:86-99.
- Bechtel, D. B. y Bulla Jr, L. A. 1976. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 127 (3): 1472-1481.
- Beegle, C. C. y Yamamoto, T. 1992. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. Invitation Paper (C.P. ALEXANDER FUND). *Can Entomol.* 124: 587-616.
- Berry, C., O'Neil, S., Ben-Dov, E., Jones, A. F., Murphy, L., Quail, M. A., Holden, M. T. G., Harris, D., Zaritsky, A. y Parkhill, J. 2002. Complete sequence and organization of pBtoxins, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5082-5095.
- Ben-Dove, E. 2014. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. *Toxins.* 6: 1222-1243.
- Bidesh, D. K., Park, H-W., Hice, R. H., Wirth, M. C. y Federici, B. A. 2017. Highly Effective Broad Spectrum Chimeric Larvicide That Targets Vector Mosquitoes Using a Lipophilic Protein. *Sci. Rep.* 7: 11282.
- Boonserm, P., Angsuthanasombat, M. Mo. C. y Lescar, J. 2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Angstrom resolution. *J. Bacteriol.* 188 (9): 3391-3401.

-
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D. J. y Li, J. 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal of Diphtheria toxin and its implications for membrane penetration. *Biochem.* 24: 5458-5464.
- Bosch, D., Schipper, B., Van der Klei, H., De Maagd, R.A. y Stiekema, W.J. 1994. Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. *Bio/Tech* 12: 915–918.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72: 248-254.
- Brandt, C. R., Adang, M. J. y Spence, K. D. 1978. The peritrophic membrane: ultrastructural analysis and functions as a mechanical barrier to microbial infection in *Orgyia pseudotsugata*. *J. Invertebrate. Pathol.* 32:14-24.
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S. S. y Soberón, M. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochem Biophys Acta.* 1667: 38-46.
- Cantón, P. E., Reyes, E. Z., Escudero, I. R., Bravo, A., y Soberón, M. 2010. Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. *Peptides.* 32, 595-600.
- Chandra, A., Ghosh, P., Mandaokar, A.D., Bera, A.K., Sharma, R.P., Das S et al. 1999. Amino acid substitution in alpha-helix 7 of CryIAc delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* leads to enhanced toxicity to *Helicoverpa armigera* Hubner. *FEBS Lett* 458: 175–179.
- Chandrashekar, K., Kumari, A., Kalia, V. y Gujar, G. T. 2005. Baseline susceptibility of the American bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) to *Bacillus thuringiensis* Berl var. *kurstaki* and its endotoxins in India. *Curr Sci.* 88:167–175.
- Chen, X. J., Lee, M. K., y Dean, D. H. 1993. Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombyx mori* midguts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 90 : 9041-9045.
- Chougule, N. P., Li, H., Liu, S., Linz, L. B., Narva, K. E., Meade, T. y Bonning, B. C. 2013. Retargeting of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cyt2Aa against hemipteran insect pest. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 10: 8465-8470.

-
- Cohen, S., Albeck, S., Ben-Dov, E., Cahan, R., Firer, M., Zaritsky, A. y Dym, O. 2011. Cyt1Aa toxin: crystal structure reveals implications for its membrane perforating function. *J. Mol. Biol.* 413: 804-814.
- Cohen, S., Dym, O., Albeck, S., Ben-Dov, E., Cahan, R., Firer, M. y Zaritsky, A. 2008. High resolution crystal of activated Cyt2Ba monomer from *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis. *J. Mol. Biol.* 380: 820–827.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, D. y Dean, D. H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 807-813.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A. y Dean, D. H. 2012. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature, http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bti.
- Dar, S. A., Wani, A. B. y Kandoo, A. A. 2017. Genetic engineering and insect resistance. *J. Entomol. Zool. Stud.* 5(53):1175-1184.
- De Maagd, R. A., Bravo, A., Crickmore, N., Berry, C. y Schnepf, H. E. 2003. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Ann. Rev. Gen.* 37:409-433.
- De Maagd, R. A., Weemen-Hendriks, M., Stiekema, W. y Bosch, D. 2000. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1–Cry1C hybrids. *Appl Environ Microb* 66:1559–1563.
- De Maagd, R.A., Bravo, A. y Crickmore, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonise the insect world. *Trends Genet* 17(4):193–199.
- Derbyshire, D. J., Ellar, D. J. y Li, J. 2001. Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine. *Acta Crystall. Sect. D.* 57: 1938-1944.
- Ding, X., Luo, Z., Xia, L., Gao, B., Sun, Y. y Zhang, Y. 2008. Improving the insecticidal activity by expression of a recombinant cry1Ac gene with chitinase-encoding gene in acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis*. *Curr Microbiol.* 56:442–447.
- Dow, J. A. 1992. pH gradients in lepidopteran midgut. *J. Exp. Biol.* 172(pt 1): 355-377.
- Federici, B. A. 2005. Insecticidal bacteria: an overwhelming success for invertebrate pathology. *J Invertebr Pathol.* 89: 30-38.

-
- Federici, B. A., Park, H.-W., Bidesh, D. K., Wirth, M. C. y Johnson, J. J. 2003. Recombinant bacteria for mosquito control. *J Exp Biol.* 206: 3877-3885.
- Federici, B.A. y Bauer, L.S. 1998. Cyt1Aa protein of *Bacillus thuringiensis* is toxic to the cottonwood leaf beetle, *Chrysomela scripta*, and suppresses high levels of resistance to Cry3Aa. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:68–4371.
- Fernández, L. E., Aimonava, K. G., Gill, S. S., Bravo, A. y Soberón, M. 2006. A GPI-anchored alkaline phosphatasa is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *J.Biol.Chem.* 394:77-84.
- Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J. R., Pangborn, W. y English, L. 2001. Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystall. Sec. D.* 57: 1101-1109.
- Gazit, E., Burshtein, N., Ellar, D. J., Sawyer, T. y Shai, Y. 1997. *Bacillus thuringiensis* Cytolytic Toxin Associates Specifically with its Synthetic Helices A y C in the Membrane Bound State. Implications for the Assembly of Oligomer Transmembrane pores. *Biochem.* 36: 15546-15554.
- Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köl, J., Marrone, P., Morin, L. y Stewart, A. 2012. Have biopesticides come of age?. *Trends Biotechnol.* 30(5):250-258.
- Gómez, I., Arenas, I., Benitez, I., Miranda-Rios, J., Becerril, B., Grande, R., Almagro, J. C., Bravo, A. y Soberón, M. 2006. Specific epitopes of domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N Receptors in *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* 281: 34032-34039.
- Gómez, I., Dean, D. H., Bravo, A. y Soberón, M. 2003. Molecular Basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin Specificity: Two Structural Determinants in the *Manduca sexta* Bt-R1 Receptor Interact with Loops α -8 and 2 in Domain II of Cry1Ab Toxin. *Biochem.* 42: 10482-10489.
- Gómez, I., Miranda-Rios, J., Rudiño-Piñera, E., Oltean, D. I., Gill, S.S., Bravo, A. y Soberón, M. 2002(a). Hydrophatic complementarity determines interaction of epitope 869HITDTNKN876 in *Manduca sexta* Bt-R1 receptor with Loop 2 of Domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxins. *J. Biol. Chem.* 277: 30137-30143.
- Gómez, I., Pardo-López, L., Muñoz-Garay, C., Fernández, L. E., Pérez, C., Sánchez, M., Soberón, M. y Bravo, A. 2007. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* 28:169–173.

-
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A. y Soberón, M. 2002(b). Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Letters*. 513: 242-246.
- Gou, S., Ye, S., Liu, Y., Wei, L., Xue, J., Wu, H., Song, F., Zhang, J., Wu, X., Huang, D. y Rao, Z. 2009. Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *J. Struct. Biol.* 168: 259-266.
- Gringorten, J. L., Milne, R. E., Fast, P. G., Sohi, S. S. y Van Frankenhuyzen, K. 1992. Suppression of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin activity by low alkaline pH. *J. Invertebr. Pathol.* 60: 47-52.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.L., Brousseau, R. y Cygler, M. 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254: 447-464.
- Güereca, L., Bravo, A. y Quintero, R. 1994. Design of an aqueous two-phase system for the purification of ICP from *Bacillus thuringiensis*. *Process Biochem.* 29: 181-185.
- Guerchicoff, E., Delecluse, A. y Rubinstein, C. P. 2001. The *Bacillus thuringiensis* cyt genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(3):1090-1096.
- Höfman, C., Vanderbruggen, H., Hofte, H., Van Rie, J., Jansens, S. y Van Mellaert, H. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin is correlated with the presence of high affinity binding sites in the brush border membrane or target insect midguts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 85: 7844-7848.
- Höfte, H. y Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev.* 53: 242-255.
- Honée, G., Convents, D., Rie, J.V., Jansens, S., Peferoen, M. y Visser, B. 1991. The C-terminal domain of the toxic fragment of *Bacillus thuringiensis* crystal protein determines receptor binding. *Mol Microbiol* 5: 2799-2806.
- Honée, G., Vriezen, W. y Visser, B. 1990. A translation fusion product of two different insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* exhibits an enlarged insecticidal spectrum. *Appl Environ Microbiol* 56: 823-825.
- Hong, Huynh. A., Duc, Le Hong. y Cutting, Simon M. 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 813-835.

-
- Hui, F., Scheib, U., Hu, Y., Sommer, R.J., Aroian, R.V., y Ghosh, P., 2012. Structure and Glycolipid Binding Properties of the Nematicidal Protein Cry5B. *Biochem.* 51: 9911-9921.
- Ibarra, J. E., Del Rincón Castro, M. C., Galindo, E., Patiño, M., Serrano, I., García, R., Carrillo, J. A., Pereyra-Alfárez, B., Alcázar-Pizaña, A., Luna-Olvera, H., Galán-Wong, L., Pardo, I., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Soberon, M y Bravo, A. 2006. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 48 (2):113-120.
- James, C. 2017. Global status of commercialized biotech/GM crops. ISAAA Briefs 53: (ISAAA, Ithaca, NY, 2017).
- Jurat-Fuentes, J. L. y Adang, M. J. 2004. Characterization of a Cry1Ac receptor alkaline phosphatasa in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J. Biol. Chem.* 271: 3127-3135.
- Karlova, R., Weemen-Hendriks, M., Naimov, S., Ceron, J., Dukiandjiev, S. y De Maagd, R. A. 2005. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Cry1Ac domain III enhances activity against *Heliothis virescens* in some, but not all Cry1–Cry1Ac hybrids. *J Invertebr Pathol* 88: 169–172.
- Kaya, H. K. y Vega, F. E. 2012. Scope and Basic Principles of Insect Pathology. En: *Insect Pathology*. Pp: 461-479.
- Knight, P. J., Crickmore, N. y Ellar, D. J. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA (c) δ -endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 11: 429-436.
- Knowles, B. H. y Dow, J. A. 1993. The crystal δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action in the insect gut. *Bioassay.* 15: 469-475.
- Knowles, B. H., White, P. J., Nicholls, C. N. y Ellar, D. J. 1992. A broad-spectrum cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Medellin*. *Proc. R. So. Lon. Se. B-Biol. Sci.* 248: 1-7.
- Knowles, B.H., Blatt, M.R., Tester, M., Horsnell, J. M., Carroll, J., Menestrina, G. y Ellar, D.J. 1989. A cytolytic δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *FEBS Letters.* 244: 259-262.
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K. y Vail, P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Bio. Control.* 21:230-248.

-
- Lee, M. K., Milne, R. E., Ge., A. Z. y Dean, D. H. 1992. Location of a *Bombyx mori* receptor binding región on a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *J. Biol. Chem.* 267:3115-3121.
- Li, H. y Bouwer, G. 2012. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in South Africa. *J Invertebr Pathol.* 109(1):110–116.
- Li, J., Carroll, J. y Ellar, D. J. 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 (Angstrom) resolution. *Nature.* 353: 815-821.
- Li, J., Derbyshire, D. J., Promdonkoy, B. y Ellar, D. J. 2001. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochem Soc Trans.* 29: 571-577.
- Liao, C., Heckel, D. G. y Akhurst, R. 2002. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton. *J Invertebr Pathol* 80(1):55–63.
- Liu, X. S. y Dean, D. H. 2006. Redesigning *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin into a mosquito toxin. *Prot. Eng. Design. Selec.* 19:107–111.
- López-Díaz, J., Cantón, P. E., Gill, S., Soberón, M. y 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. *Environ Microb.* 15(11):3030–3039.
- Maddrell, S. H., Lane, N. J., Harrison, J. B., Overton, J. A. y Moreton, R. B. 1988. The initial stages in the action of an insecticidal delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on the epithelial cells of the malpighian tubules of the insect, *Rhodnius prolixus*. *J Cell Sci.* 90(1):131–144.
- Manceva, S. D., Pusztai-Carey, M., Russo, P. S. y Butko, P. 2005. A detergent-like mechanism of action of cytolytic toxin Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Biochem.* 44: 589-597.
- Mandal, C.C., Gayen, S., Basu, A., Ghosh, K. S., Dasgupta, S., Maiti, M. K. y Sen, S. K. 2007. Prediction-based protein engineering of domain I of Cry2A entomocidal toxin of *Bacillus thuringiensis* for the enhancement of toxicity against lepidopteran insects. *Protein Eng Des Sel.* 20(12):599–606.
- Meyer, S. K., Tabashnik, B. E., Liu, Y. B., Wirth, M. C. y Federici, B. A. 2001. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* Lacks Toxicity to Susceptible and Resistant Larvae of Diamondback Moth (*Plutella xylostella*) and Pink

-
- Bollworm (*Pectinophora gossypiella*). *Appl Environ Microbiol.* 67(1): 462–463.
- Morse, R. J., Yamamoto, T. y Stroud, R. M. 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure.* 9: 409-417.
- Murray, K. O., Ruktanonchai, D., Hesalroad, D., Fonken, E. y Nolan, M. S. 2013. West Nile Virus, Texas, USA, 2012. *Emerg Infect Dis.* 19(11):1836–1838.
- Naimov, S., Weemen-Hendriks, M., Dukiandjiev, S. y De Maagd, R.A. 2001. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Cry1 hybrid proteins with increased activity against the Colorado potato beetle. *Appl Environ Microb* 67: 5328–5330.
- Pacheco, S., Gómez, I., Arenas, I., Saab-Rincon, G., Rodríguez-Almazán, C., Gill, S. S., Bravo, A. y Soberón, M. 2009. Domain II Loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a “Ping pong” binding mechanism with *Manduca sexta* Aminopeptidase-N and Cadherin receptor. *J. Biol. Chem.* 284 :32750-32757.
- Pandelakis, Li. J., Koni, A. y Ellar, D. J. 1996. Structure of the Mosquitocidal δ -Endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J. Mol. Biol.* 257:129–152.
- Pardo-López, L., Muñoz-Garay, C., Porta, H., Rodriguez-Almazán, C., Soberon, M. y Bravo, A. 2009. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* 30(3): 589–595.
- Pardo-López, L., Soberón, M. y Bravo, A. 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS. Microbiol. Rev.* 37: 3-22.
- Pérez, C., Fernandez, L. E., Sun, Jianguang., Folch, J. L. Gill, S. S., Soberón, Mario y Bravo, A. 2005. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci.USA.* 102(51): 18303–18308.
- Pérez, C., Muñoz-Garay, C., Portugal, L. C., Sánchez, J., Gill, S. S., Soberón, M., y Bravo A. 2007. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. *Cell. Microbiol.* 9:2931-2937.
- Peterson, B., Bezuidenhout, C.C. y Van den Berg, J. 2017. An overview of mechanisms of Cry toxin resistance in lepidopteran insects. *J Econ Entomol.* 110(2):362-377.
- Pigott, C. R. y Ellar, D. J. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71: 255-281.

-
- Porter, A. G., Davidson, E. W. y Liu, J. W. 1993. Mosquitocidal toxins of Bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. *Microbiol. Rev.* 57(\$): 838-861.
- Rajamohan, F., Alzate, O., Cotrill, J. A., Curtiss, A. y Dean, D. H. 1996. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: mutations at domain II of CryIAb enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14338–14343.
- Rang, C., Vachon, V., Coux, F., Carret, C., Moar, W.J., Brousseau, R., Schwartz, J. L., Laprade, R. y Frutos, R. 2001. Exchange of domain I from *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins influences protoxin stability and crystal formation. *Curr Sci* 43(1):1–6.
- Rosell, G., Quero, C., Coll, J. y Guerrero, A. 2008. Biorational insecticides in pest management. *J Pest Sci.* 33 (2): 103-121.
- Sakai, H., Howlader, M.T.H., Ishida, Y., Nakaguchi, A., Oka, K., Ohbayashi, K., Yamagiwa, M. y Hayakawa. T. 2007. Flexibility and strictness in functional replacement of domain III of cry insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *J Biosci Bioeng* 103(4):381–383.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T. y Christou, P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol J.* 9: 283-300.
- Sangadala, S., Walters, F. S., English, L. H. y Adang, M. J. 1994. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and 86Rb-K efflux in vitro. *J. Biol. Chem.* 269: 10088-10092.
- Sayyed, A. H., Crickmore, N. y 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. *App. Environ. Microbiol.* 67(12):5859-5861.
- Schaeffer, P., Millet, J. y Aubert, J. P. 1965. Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 54: 704–711.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. y Dean, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
- Shan, J. V., Yadav, R. e Ingle, S. S. 2017. Engineered Cry1Ac-Cry9Aa hybrid *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin with improved insecticidal activity against *Helicoverpa armigera*. *Arch Microbiol.* 199: 1069-1075.

-
- Shao, E., *et al.* 2016. Loop replacements with gut-binding peptides in Cry1Ab domain II enhanced toxicity against the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal). *Scientific Rep.* 6: 20106.
- Singh, P. K., Kumar, M., Chaturvedi, C. P., Yadav, D. y Tuli, R. 2004. Development of a hybrid δ -endotoxin and its expression in tobacco and cotton for control of a polyphagous pest *Spodoptera litura*. *Transgenic Res.* 13: 397–410.
- Soberon, M., Pardo-López, L., López, I., Gómez, I., Tabashnik, B. E. y Bravo, A. 2007. Engineering Modified Bt Toxins to Counter Insect Resistance. *Science.* 318: 1640.
- Souza-Neto, J. A., Gusmao, D. S. y Lemos, F. J. 2003. Chitinolytic activities in the gut of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae and their role in digestion of chitin rich structures. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol Integr Physiol.* 136(3):717-724.
- Su, Y., Zhao, Q., Zheng, D., Ding, X., Wang, J., Hu, Q., Yuan, Z., Park, H-W. y Xia, L. 2014. Construction and Characterization of the interdomain chimeras using Cry11Aa and Cry11Ba from *Bacillus thuringiensis* and identification of a possible novel toxic chimera. *Biotechnol Lett.* 36: 105-111.
- Suktham, K., Pathaichindachote, W., Promdonkoy, B. y Krittanai, C. 2013. Essential role of amino acid in α D- β 4 loop of *Bacillus thuringiensis* Cyt2Aa2 toxin in binding and complex formation on lipid membrane. *Tóxico.* 74: 130-137.
- Tabashnik, B. E. y Carrière, Y. 2017. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. *Nat Biotechnol.* 35(10): 926-935.
- Tabashnik, B. E. 1992. Evaluation of synergismo among *Bacillus thuringiensis* toxins. *App. Environ. Microbiol.* 58: 3343-3346.
- Thamthiankul, S., Suan-Ngay, S., Tantimavanich, S. y Panbangred, W. 2001. Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp *Pakistani*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:395-401.
- Thomas, W. E. y Ellar, D. J. 1983a. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. *J. Cell Sci.* 60:181–197.
- Thomas, W.E. y Ellar, D.J. 1983b. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* insecticidal δ -endotoxin. *Letters* 154: 362-368.

-
- Walters, F. S., Stacy, C.M., Lee, M. K., Palekar, N. y Chen, J. S. 2008. An engineered chymotrypsin/cathepsin G site in domain I render *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa active against western corn root worm larvae. *Appl Environ Microbiol.* 74:367–374.
- Wirth, M.C., Georghiou, G.P. y Federici, B.A.1997. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Proc. Nat. Aca. Sci.* 94: 10536–10540.
- Wiwat, C., Thaithanun, S., Pantuwatana, S. y Bhumiratana, A. 2000. Toxicity of chitinase producing *Bacillus thuringiensis* ssp. *Kurstaki* HD-1 (G) toward *Plutella xylostella*. *J. Invertebr. Pathol.* 76:270-277.
- Wolfesberg, M. G., Chen, X. J. y Dean. D. H. 1996. Site-directed mutations in the third domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIAa affect its ability to increase the permeability of *Bombyx mori* midgut brush border membrane vesicles. *App. Environ. Microbiol.* 62: 279-28.
- Wu, D., Johnson, J. J. y Federici, B. A. 1994. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIV proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Mol. Microbiol.* 13: 965–972.
- Wu, S.J., Koller, C.N., Miller, D. L., Bauer, L.S. y Dean, D.H. 2000. Enhanced toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3A δ -endotoxin in coleopterans by mutagenesis in a receptor binding loop. *FEBS Lett* 473(2):227–232.

ANEXO 1 Y 2

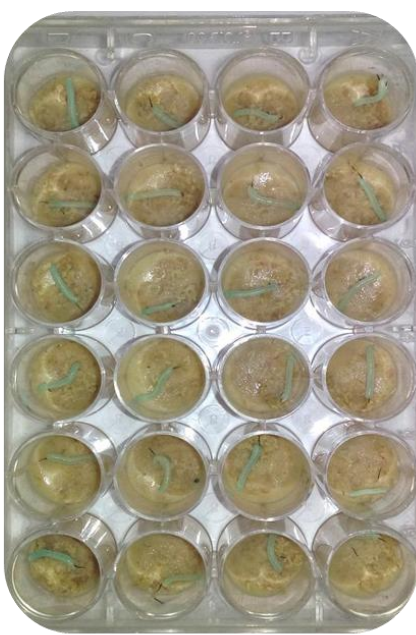
**SINTOMAS DE INFECCIÓN EN *M. sexta* A LOS 7 Y 14 DIAS DESPUES DE
SER EXPUESTAS A LAS VARIANTES DE LA TOXINA Cyt1Aa.**

ANEXO 1.

Fotografías de las larvas de *M. sexta* a los 7 días después de ser expuestas a las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 3 de Cry1Ab en las asas 6, 7 y 9 de la toxina Cyt1Aa. Resultados similares se observaron para las variantes con la inserción del asa 2.



Agua



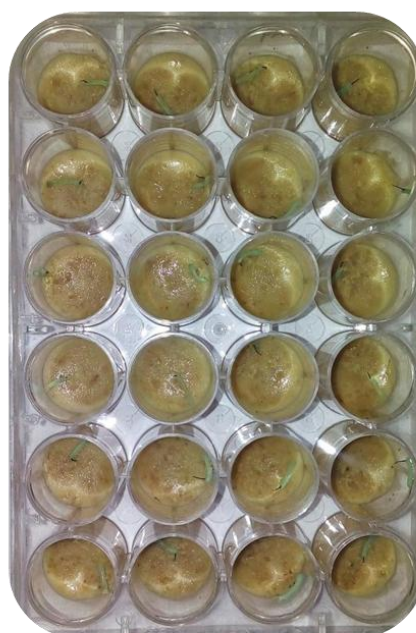
**Cyt1Aa silvestre
2 µg/cm²**



**CytA3-Asa6
2 µg/cm²**



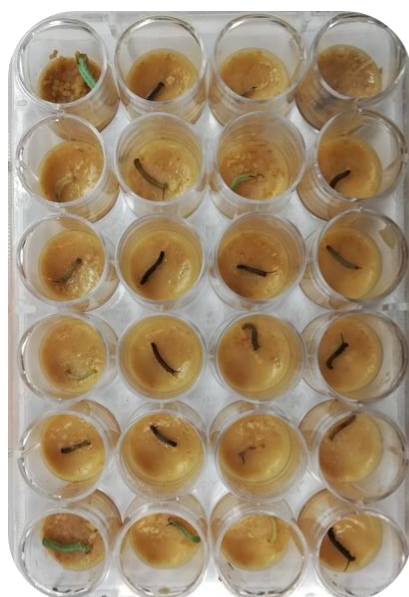
**CytA3-Asa7
2 µg/cm²**



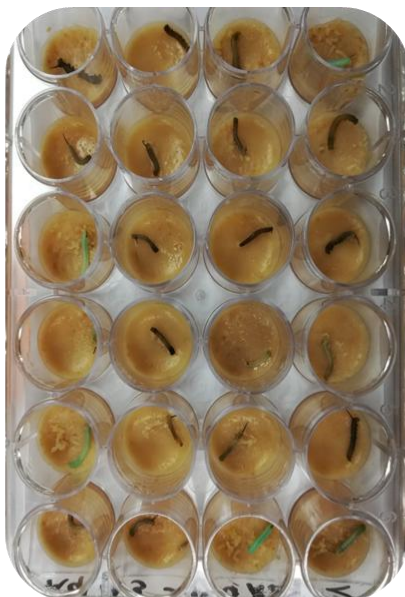
**CytA3-Asa7
2 µg/cm²**

ANEXO 2.

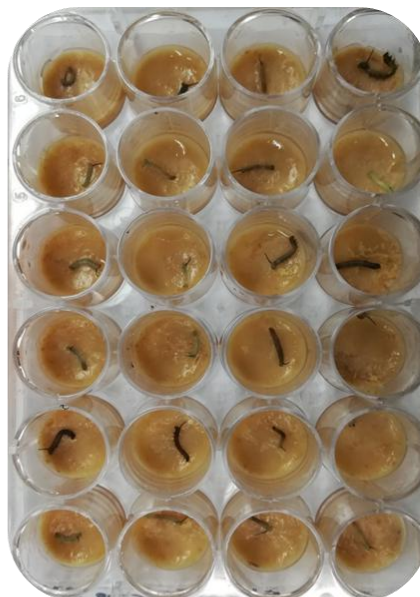
Fotografías de las larvas de *M. sexta* a los 14 días después de ser expuestas a las variantes de la toxina Cyt1Aa que tienen la inserción del asa 3 de Cry1Ab en las asas 6, 7 y 9 de la toxina Cyt1Aa. Resultados similares se observaron para las variantes con la inserción del asa 2.



CytA3-Asa6
2 µg/cm²



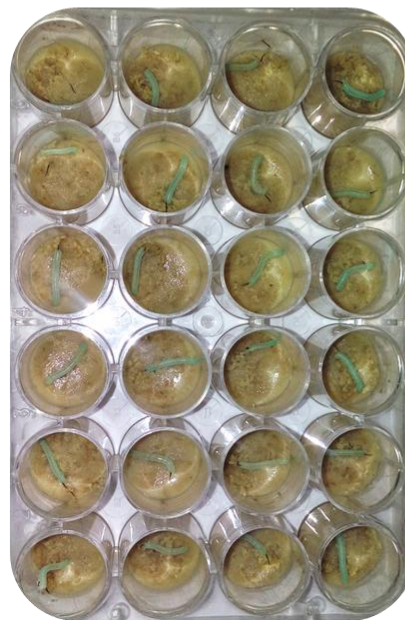
CytA3-Asa7
2 µg/cm²



CytA3-Asa9
2 µg/cm²



Agua



Cyt1Aa silvestre
2 µg/cm²



ANEXO 3
PUBLICACIÓN DERIVADA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Engineering *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa toxin specificity from dipteran to lepidopteran toxicity

Mary-Carmen Torres-Quintero, Isabel Gómez, Sabino Pacheco, Jorge Sánchez, Humberto Flores, Joel Osuna, Gretel Mendoza, Mario Soberón & Alejandra Bravo 

The Cyt and Cry toxins are different pore-forming proteins produced by *Bacillus thuringiensis* bacteria, and used in insect-pests control. Cry-toxins have a complex mechanism involving interaction with several proteins in the insect gut such as aminopeptidase N (APN), alkaline phosphatase (ALP) and cadherin (CAD). It was shown that the loop regions of domain II of Cry toxins participate in receptor binding. Cyt-toxins are dipteran specific and interact with membrane lipids. We show that Cry1Ab domain II loop3 is involved in binding to APN, ALP and CAD receptors since point mutation Cry1Ab-G439D affected binding to these proteins. We hypothesized that construction of Cyt1A-hybrid proteins providing a binding site that recognizes gut proteins in lepidopteran larvae could result in improved Cyt1Aa toxin toward lepidopteran larvae. We constructed hybrid Cyt1Aa-loop3 proteins with increased binding interaction to *Manduca sexta* receptors and increased toxicity against two Lepidopteran pests, *M. sexta* and *Plutella xylostella*. The hybrid Cyt1Aa-loop3 proteins were severely affected in mosquitocidal activity and showed partial hemolytic activity but retained their capacity to synergize Cry11Aa toxicity against mosquitos. Our data show that insect specificity of Cyt1Aa toxin can be modified by introduction of loop regions from another non-related toxin with different insect specificity.

During sporulation, *Bacillus thuringiensis* (Bt) produce different kinds of insecticidal toxins such as Cry and Cyt toxins that have been used commercially worldwide to control different insect pests^{1,2}. The family of Cry toxins composed of three-domains (3d-Cry) and the Cyt toxins of Bt are not related phylogenetically. Different 3d-Cry toxins show high insecticidal activity against dipteran, lepidopteran and coleopteran larvae or against nematodes. In contrast, the Cyt toxins show mainly dipteran specificity^{1,3}. However, Cyt toxins also display relatively low toxicity against other insect orders such as coleopteran, hemipteran and hymenopteran suggesting that Cyt toxins could be potentially useful for the control of insect pest different from mosquitoes⁴⁻¹⁰. It is interesting that Cyt toxins have been frequently found in Bt strains that express dipteran specific 3d-Cry toxins and that Cyt1Aa is able to synergize the activity of Cry4Aa, Cry4Ba or Cry11Aa toxins against mosquitoes^{11,12}. In addition, it was found that Cyt1Aa toxin is able to overcome the resistance of the *Culex quinquefasciatus* populations to Cry4Aa, Cry4Ba or Cry11Aa toxins¹³.

The Cyt and 3d-Cry toxins are both pore-forming proteins. The Cyt toxins are composed by a single α - β domain¹⁴ that directly interacts with the membrane lipids, no protein receptor has been described. Cyt toxin insert into the membrane forming pores or by damage the membrane structure by a detergent like interaction^{15,16}. On the other hand, the 3d-Cry toxins have a three domain structure, where domain I is involved in pore formation and domains II and III participate in the interaction with different protein receptors, thus conferring specificity to the toxin. The 3d-Cry toxins showed a complex mechanism of action that requires the interaction with several proteins in the insect gut such as aminopeptidase N (APN), alkaline phosphatase (ALP) and cadherin (CAD) before insertion into the membrane and pore formation¹. The Cry1Ab toxin regions involved in these interactions have been mapped. Domain II loop 3 of Cry1Ab plays an important role in the binding of this toxin to *Manduca sexta* APN and CAD receptors¹⁷, while loop 2 and loop α -8 also participate in CAD binding¹⁸. Mutations in these loops have resulted in proteins with lower or increased toxicity against specific insect pests, correlating with lower or higher binding affinities to brush border membrane vesicles (BBMV) from those insects¹⁹. Modification of loop sequences have resulted in proteins with changed specificity such as the

Departamento de Microbiología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. postal 510-3, Cuernavaca, 62250, Morelos, Mexico. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.B. (email: bravo@ibt.unam.mx)

Cry1Aa-hybrid toxin that display similar amino acid sequence to the loops of Cry4Ba toxin, and acquired toxicity to dipteran larvae²⁰. Similarly, the introduction of two peptide sequences, selected to bind to BBMV from the hemipteran insect *Nivalopavata lugens*, into the Cry1Ab domain II exposed loops resulted in a Cry1Ab-hybrid toxin with enhanced toxicity against *N. lugens*²¹. In the case of Cyt toxin, construction of hybrid toxins have also resulted in improved toxicity against specific targets, such as the Cyt2Aa-hybrid toxins containing the sequence of a 12 amino acid GBP3 peptide that binds to an aphid APN. These Cyt2A-hybrid toxins were constructed in three different exposed loops of the toxin, showing enhanced toxicity against the hemipteran insects such as *Acyrtosiphon pisum* and *Myzus persicae*²².

Here, we describe the rational migration of Cyt1Aa toxicity from dipteran to lepidopteran insects by constructing Cyt1Aa-hybrid toxins containing the sequence of Cry1Ab domain II loop 3. The hypothesis behind the construction of these hybrid toxins is that providing a binding site that recognizes gut proteins in lepidopteran larvae would result Cyt1Aa-hybrid proteins that display toxicity against lepidopteran. We show here that loop 3 of Cry1Ab is involved in the binding interaction with different receptors such as APN, ALP and CAD. We constructed Cyt1Aa-loop3 hybrid proteins containing this loop 3 sequence in different locations of Cyt1Aa. Some of these Cyt1Aa-hybrid proteins showed increased binding to *M. sexta* receptors that correlated with insecticidal activity against two lepidopteran species, *M. sexta* and *Plutella xylostella*. Our data shows that insect specificity of Cyt toxins can be modified by the introduction of loop regions from non-related toxins with different insect specificity.

Results

Binding analysis of Cry1Ab-G439D mutant protein to APN, ALP and CAD receptors. The cloning of the recombinant ALP and CAD fragment containing Cry1Ab binding sites (CAD-CR12) was previously reported^{17,23}. Here we cloned the APN1 gene from *M. sexta* and expressed it into *E. coli* cells as reported in Materials and Methods.

It was previously reported that mutants in loop 3 region from Cry1Ab are affected in toxicity to *M. sexta* and showed reduced binding to APN1 and CAD receptors as compared with the wild type Cry1Ab toxin¹⁷. Also, that Cry1Ab-G439D loop 3 mutant was affected in binding to CAD-CR12²⁴. The binding of Cry1Ab loop3 mutants to ALP receptor was not analyzed before. Here we analyzed the binding of Cry1Ab-G439D loop 3 mutant to ALP, APN1 and CAD-CR12. Figure 1 shows that Cry1Ab-G439D mutant was also affected in binding to ALP, indicating that Cry1Ab domain II loop 3 is also involved in the binding with this receptor.

Construction of Cyt1Aa-loop3 hybrid toxins. Based in the three-dimensional structure of Cyt1Aa toxin²⁵ we identified twelve exposed loop regions. We selected ten of these loops to insert the amino acid sequence of the Cry1Ab domain II loop3 (FRSGFSNSSVSI) (Fig. 2). We did not insert the peptide sequence into loops 11 and 12 of Cyt1Aa since it was previously shown that these loops were involved in the binding interaction and synergism with Cry11Aa and Cry4Ba toxins^{11,12}. The loop regions of Cyt1Aa that were selected to introduce the Cry1Ab loop3 are highlighted with red letters in Fig. 2A. The location of these loops in the Cyt1Aa structure showed that all of them are exposed to the solvent (Fig. 2B).

Ten hybrid-Cyt1Aa mutants were constructed and confirmed by DNA sequence. The presence of crystal-like inclusions was confirmed by observations under phase contrast optical microscopy and by SDS-PAGE gels of protoxins. SDS-PAGE gels showed that constructs in loop1, loop2 and loop3 of Cyt1Aa did not produce protein in Bt and were not further analyzed (data not shown). The crystal-like inclusions from the remaining seven constructs were purified and the protoxins were solubilized and activated with trypsin. Figure 3A shows the purified trypsin activated toxins, as well as the western blot detection of the solubilized (Fig. 3B) and activated proteins (Fig. 3C).

Binding analysis of Cyt1Aa-hybrid proteins to APN, ALP and CAD receptors. The binding of Cyt1Aa-hybrid variants to recombinant *M. sexta* APN1, ALP and CAD-CR12 was analyzed by ELISA binding assays. The variants CytL3-Loop6, CytL3-Loop7 and CytL3-Loop9 showed significant binding to the three receptor proteins (Fig. 4), showing 2 to 7 fold higher binding to ALP; 2 to 8 fold higher binding to APN1, and 1.5 to 4 fold higher binding to CAD-CR12 when compared with the binding of the control Cyt1Aa toxin (ANOVA analysis $P < 0.005$). The rest of the hybrid Cyt1A proteins showed less binding to the *M. sexta* receptors than CytL3-Loop7 (data not shown).

Toxicity against mosquitoes and hemolytic activity. The toxicity of the seven hybrid-Cyt1Aa mutants and the Cyt1Aa was analyzed in bioassays by feeding third instar *A. aegypti* larvae with the purified crystal-like suspensions. The medium lethal concentration of wild type Cyt1Aa was 146.2 ng/ml (32–253, 95% confidential limits). In contrast, the hybrid-Cyt1Aa mutants showed no toxicity against *A. aegypti* even at 10 µg/ml (maximal concentration used) (data not shown). The toxicity of these constructions was also tested in bioassays using 10 µg/ml of soluble protein against first instar *A. aegypti* larvae as described in materials and methods. Under these conditions all proteins including the wild type Cyt1Aa were inactive (data not shown).

Cyt1Aa protein synergizes Cry11Aa activity and has hemolytic activity. In order to determine the functionality of these Cyt1Aa-hybrid proteins we analyzed these two activities. The synergism with Cry11Aa toxin was determined by performing bioassays against early *A. aegypti* 3rd-instar larvae as described in Materials and Methods. We used a low concentration of these proteins that accounts for extremely low mortality when tested individually. Mortality was 20% with Cry11Aa alone (108 ng/ml Cry11Aa) and no-mortality was observed with Cyt1Aa or hybrid-Cyt1Aa alone (30 ng/ml Cyt1Aa) (Fig. 5). However, when both proteins Cyt1Aa and Cry11Aa were assayed together in the same mixture, more than 95% mortality was observed revealing synergism between these two proteins. The synergism factor (SF) of the wild type proteins was calculated as reported in Materials and Methods showing a SF value of 17.2 fold. Results obtained with the Cyt1A-hybrid proteins showed that mixtures

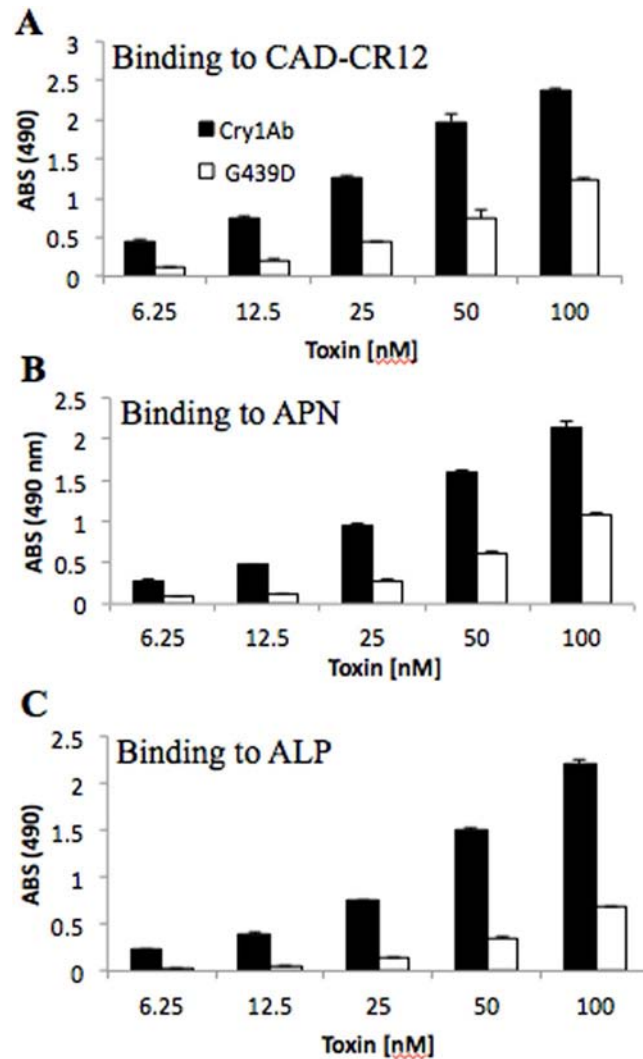


Figure 1. Analysis of binding of Cry1Ab-G439D mutant toxin in loop3 of domain II to purified APN1, ALP or CAD proteins. ELISA plates were coated with 0.5 μ g of each recombinant receptor protein (APN1, ALP or CAD) and the binding of different concentrations of wild type or mutant toxin was analyzed. Each experiment was performed in duplicate with a total of six repetitions for each toxin.

of all of these mutants with Cry11Aa resulted in synergistic activity since mortality increased up to 70 to 90% (Fig. 5). The synergism was also analyzed by testing for deviation from the null hypothesis of simple independent action, which assumes that the proportion of larvae surviving to the exposure of mixture of toxins is the product of the proportions of larvae that survive to the exposure of each toxin separately²⁶. The results show that synergism occurred in all mixtures of Cyt1Aa-hybrid toxins with Cry11Aa that were tested (Table 1).

The hemolytic activity of these constructions was assayed against rabbit red blood cells. The medium effective (EC_{50}) dose of Cyt1Aa was 190 ng/mL (182.4–197.8 ng/mL). Figure 6 shows that Cyt1Aa hybrid-mutants are also affected in their hemolytic activity. The maximum concentration of Cyt1Aa toxin used was 8000 ng per ml of water, at this concentration the hybrid-Cyt1Aa toxins tested showed 1.5 to 7 fold lower hemolytic activity than the wild type Cyt1Aa toxin.

Toxicity against lepidopteran larvae. Bioassays were performed against two different lepidopteran species, first instar *M. sexta* and third instar *P. xylostella* larvae. After seven days of treatment the larvae of both insects were still alive but showed to be severely affected, since they look pale and showed reduced size in comparison with the water control or the larvae treated with Cyt1Aa (Supplementary Figure S2). After 15 days of exposure to the toxins the mortality was evident (Fig. 7). Anova analysis of the data indicated that constructions CytL3-Loop6, CytL3-Loop7 and CytL3-Loop9 showed significant mortality values that ranged from 60–80% and were significantly more toxic than the other constructions CytL3-Loop4, CytL3-Loop5, CytL3-Loop8 and CytL3-Loop10 and than the control with Cyt1Aa ($P < 0.001$).

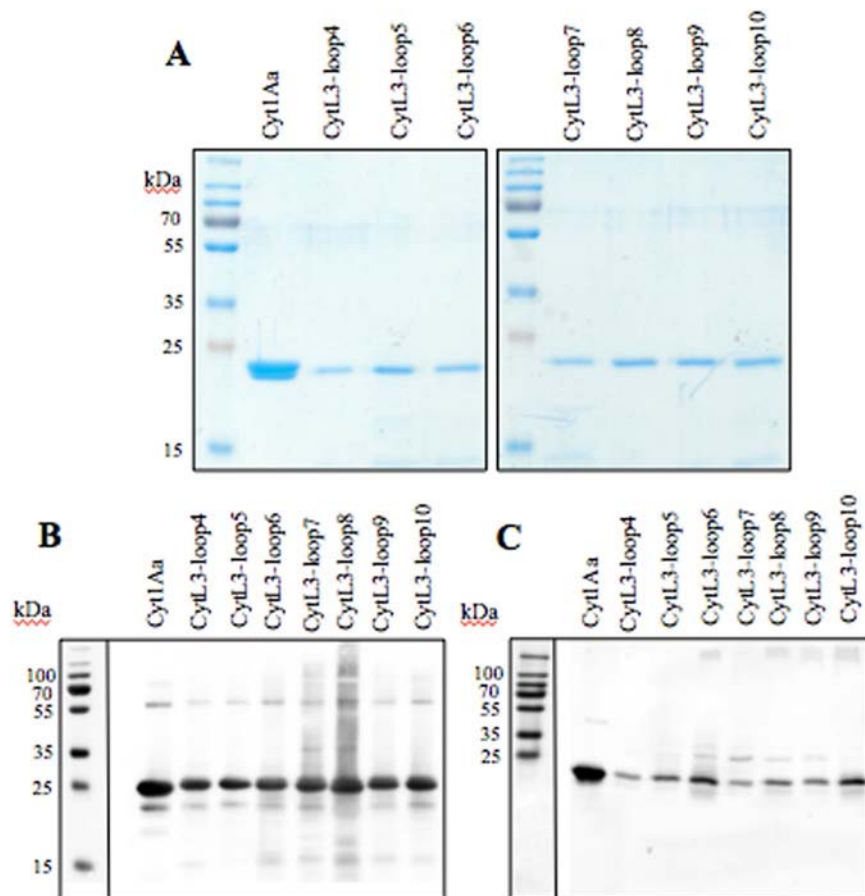


Figure 3. Purification of Cyt1Aa-hybrid proteins expressed in *B. thuringiensis* 407⁻ strain. Panel A, purified trypsin activated toxins resolved in SDS-PAGE 15% acrylamide stained with Coomassie blue. Panel B, analysis of hybrid Cyt1Aa protoxins by western blot assays using anti-Cyt1Aa polyclonal specific antibody. Panel C, analysis of hybrid Cyt1Aa activated toxins by western blot assays using anti-Cyt1Aa polyclonal specific antibody. Page ruler plus pre-stained protein ladder in panels B and C are shown as separate images.

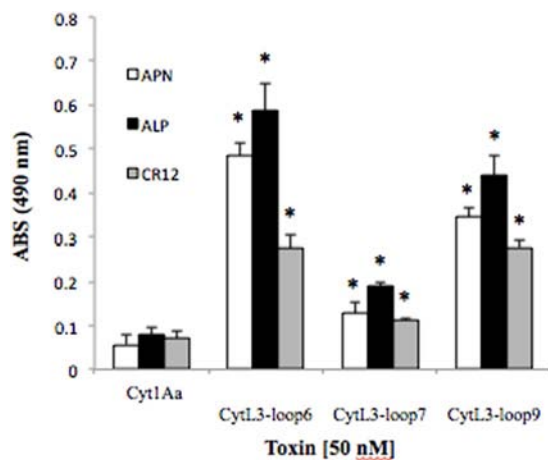


Figure 4. Analysis of binding of Cyt1Aa and hybrid-Cyt1Aa variants to purified APN1, ALP or CAD proteins. ELISA plates were coated with 0.5 μ g of each recombinant receptor protein (APN1, ALP or CAD) and the binding of 100 nM Cyt1Aa or hybrid-Cyt1Aa was analyzed. Each experiment was performed in duplicate with a total of six repetitions for each mutant Cyt1Aa toxin. *Indicate significant differences with the Cyt1Aa toxin by ANOVA with significant differences $P < 0.01$.

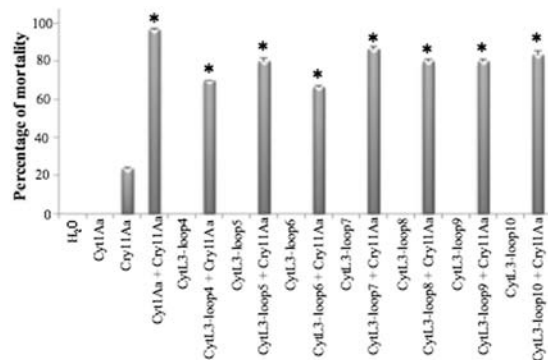


Figure 5. Analysis of synergism of Cyt1Aa or Cyt1Aa-hybrid toxins with Cry11Aa toxin. Cry11Aa toxin was used at 108 ng/ml and Cyt1Aa or hybrid-Cyt1Aa were used at 30 ng/ml. Negative control (dechlorinated water) was included in the bioassay. Larvae mortality was examined 24 h after treatment. *Indicate significant differences with the Cyt1Aa toxin by ANOVA with significant differences $P < 0.01$.

Toxin	$S_{\text{(toxin)OBS}}^a = (R1 + R2 + R3)/n$	$S_{\text{(mixture)OBS}}^b = S_{\text{(Cyt1Aa)OBS}} \times S_{\text{(Cry11Aa)OBS}}$	Expected mortality ^c = $(1 - S_{\text{(mixture)EXP}}) \times 100\%$	Observed mortality Cyt1Aa + Cry11Aa ^d
Cyt1Aa	1	0.76	24%	97% ± 0.6
CytL3-Loop4	1	0.76	24%	70% ± 0
CytL3-Loop5	1	0.76	24%	80% ± 1.7
CytL3-Loop6	1	0.76	24%	67% ± 0.6
CytL3-Loop7	1	0.76	24%	87% ± 1.2
CytL3-loop8	1	0.76	24%	80% ± 1.0
CytL3-Loop9	1	0.76	24%	80% ± 1.0
CytL3-Loop10	1	0.76	24%	83% ± 2.1
Cry11Aa	0.76			

Table 1. Synergism between Cry11Aa and Cyt1Aa-hybrid proteins against 3th instar of *Aedes aegypti* larvae. ^aObserved survival of individual toxin $S_{\text{(toxin)OBS}}$ corresponds to the observed proportion of larvae that survived to the exposure to Cyt1Aa or Cyt1Aa-hybrid mutant toxins. Observed mortality was 20% with Cry11Aa at 108 ng per ml and 0% with Cyt1Aa or mutant toxins at 30 ng per ml. $n = 30$ larvae for each toxin tested. ^bTheoretical proportion of larvae that survive to the toxin-mixture, $S_{\text{(Cyt1Aa, Cry11Aa)EXP}} = S_{\text{(Cyt1Aa)OBS}} \times S_{\text{(Cry11Aa)OBS}}$ corresponds to the proportion of larvae expected to survive to the exposure of a mixture of toxins. ^cTheoretical expected mortality was calculated with $(1 - S_{\text{(Cyt1Aa, Cry11Aa)EXP}}) \times 100\%$. ^dExperimentally observed mortality with the mixture of toxins using Cry11Aa at 108 ng per ml plus each Cyt1Aa-hybrid toxin at 30 ng per ml. These assays were performed three times. Fisher's exact test showed values of $P < 0.001$ for each comparison.

structure of Cyt1Aa toxin and the construction of the hybrid mutant in this loop1 resulted in an unstable protein. In the case of the hybrid-Cyt2Aa mutants, GBP3 constructs in loop1, loop3 and loop4 retained insecticidal activity against *A. aegypti* larvae, increased binding to membranes from the aphid insects *A. pisum* and *M. persicae* that correlated with increased toxicity against these insect pests. Cyt2Aa exposed loop3 and loop 4 corresponds to Cyt1Aa loop6 and loop9 respectively (see Supplementary Figure S3). Our data indicated that the Cyt1Aa hybrid toxins constructed in loop6 and loop9 of Cyt1Aa also resulted in improved binding and resulted in proteins that show substantial insecticidal activity against lepidopteran pests. The hybrid mutant constructed in loop 7 of Cyt1Aa also resulted in improved binding and increased toxicity against *M. sexta* and *P. xylostella* larvae. It is evident in Fig. 2B that the Cyt1Aa-hybrid mutants with increased toxicity against lepidopteran larvae are located in the same face of the Cyt1Aa toxin, suggesting that this side of the toxin is adequate to introduce novel binding sites for the toxin. However, in the case of the Cyt1Aa-hybrid mutants, the seven proteins that were constructed here were not toxic to *A. aegypti* larvae when assayed as crystal-like inclusions or as soluble proteins, in contrast with the reported Cyt2Aa-hybrid variants that retained mosquitocidal activity when assayed as soluble proteins²². In fact the wild type Cyt1Aa was also inactive when tested as soluble protoxin and only showed toxicity as crystal inclusions. We do not know the reasons for this discrepancy. Hybrid-Cyt1Aa proteins were still able to synergize Cry11Aa and showed partial hemolytic activity, indicating that the Cyt1Aa-hybrid mutants have their correct conformation. It was previously shown that insecticidal activity of Cyt1Aa is not necessary to induce synergism of Cry11Aa or Cry4Ba, since Cyt1Aa mutants affected in oligomerization and toxicity to *A. aegypti* still synergize Cry11Aa²⁸. Also, Cyt1Aa is not toxic to *Anopheles albimanus* but it is still able to synergize the toxicity of Cry11Aa and Cry4Ba toxins against this mosquito²⁶. Mosquito larvae feed by filtering and soluble proteins are poorly retained in their gut, explaining their low toxicity as soluble proteins. Cyt toxins from Bt do not bind to midgut proteins but they interact with non-saturated membrane lipids, such as phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and sphingomyelin²⁹. Once that Cyt toxin bound to lipids, it forms oligomers that insert into the

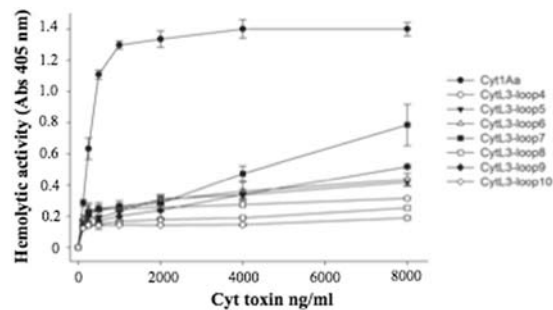


Figure 6. Hemolytic activity of Cyt1Aa and hybrid-Cyt1Aa mutants, Hemolysis was analyzed with rabbit red blood cells. These assays were performed three times and standard deviations are shown.

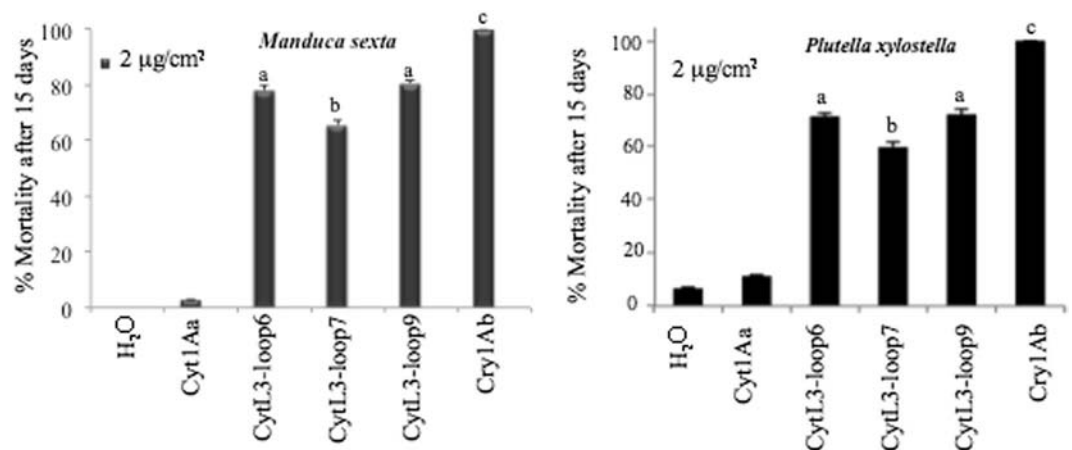


Figure 7. Toxicity of Cyt1Aa or hybrid-Cyt1Aa variants to *Manduca sexta* or *Plutella xylostella* larvae. *M. sexta* neonate or *P. xylostella* third instar larvae were treated with 2 µg of Cyt1Aa or hybrid-Cyt1Aa per cm² artificial diet. The mortality was monitored after 15 days. Twenty-four larvae were used per toxin concentration in triplicate. Letters above the bars indicate significant differences with the Cyt1Aa toxin by ANOVA with significant differences $P < 0.01$.

membrane²⁸. It was proposed that the two outer layers of α -helices hairpins swing away from the β -sheet structure, and that these β -strands insert into the membrane forming a β -barrel pore³⁰. The mechanism of action of Cyt toxins is not completely understood and an alternative model proposed that they may affect the lipid packing resulting in break down of the membrane due to a detergent like action^{16,31}. It could be possible that differences in the mechanism of action of Cyt 2Aa and Cyt1Aa toxins could account for the differences in toxicity of the hybrid Cyt2Aa or Cyt1Aa proteins to *A. aegypti*, this remains to be further analyzed.

Here we show, for the first time, that exchange of loops involved in insect specificity among toxins that are not related structurally is feasible and could provide tools for changing insect specificity and potentially for providing tools for countering resistance. A recent publication showed that Cyt1Aa-BinA hybrid toxins can be constructed resulting in hybrid-toxins with a broad-spectrum against mosquitoes including *Anopheles gambiae*, *C. quinquefasciatus* and *A. aegypti*³². These data indicate that Cyt1Aa toxin may accept larger domains and produce active proteins, suggesting that in the future other Cyt1Aa-hybrids could be constructed containing entire domains that could effectively enhance a lethal effect by Cyt1Aa in other targets. Potentiation of the insecticidal activity of these novel hybrid toxins as well as induction of synergism of these hybrid toxins with other lepidopteran specific toxins would be goal for the future work.

Materials and Methods

Construction of Cyt1Aa-hybrid toxins. A set of primer pairs was designed to insert the loop 3 amino acid sequence from Cry1Ab toxin (FRSGFSNSSVSI) into *cyt1Aa* gene by a PCR strategy. Two PCR reactions (named PCR1 and PCR2, see Table 2) were performed for each construction. The 5' end of the reverse primers used in the PCR1 reactions and the forward primers used in the PCR2 reactions, contain the sequence of loop3-*cry1Ab*, while the 3' end of these primers contains a sequence homologous to each loop region of the target *cyt1Aa* gene (Supplementary Figure S1, Table 2). Primer pairs for PCR1 and PCR2 amplifications were used in two separated PCR reactions with Vent DNA polymerase (NEB, Ipswich, MA) using plasmid pWF45 containing *cyt1Aa* gene³³ as template, as follows: 3 min at 95 °C, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 30 sec, annealing at 55 °C for 30 sec and extension at 72 °C for 35 sec, finally an additional extension at 72 °C for 3 min was performed.

Cyt1Aa Loop	PCR	Oligonucleotide	Sequence
1	2	F-loop1asa	<u>TTTAGAAGTGGATTAGTAATAGTAGTGTAAGTATT</u> CTATTAACGAAATTGATAATCC
		R-loop1 + 200	TTACATTTTGATCAACATAACTCA
	1	F-loop1 – 200	AATTTATTATGTTACTTTATATTGAT
		R-loop1asa	<u>ACTATTACTAAATCCACTTCTAAA</u> AAGAAGATTATTGATTCATTTGG
2	2	F-loop2asa	<u>TTTAGAAGTGGATTAGTAATAGTAGTGTAAGTATT</u> TATATATTGCAAGCAATTATGTTA
		R-loop1 + 200	TTACATTTTGATCAACATAACTCA
	1	F-loop1 – 200	AATTTATTATGTTACTTTATATTGAT
		R-loop2asa	<u>ACTATTACTAAATCCACTTCTAAA</u> ATTCCGATTATCAATTCGTTAATAGA
3	2	F-loop3asa	<u>TTTAGAAGTGGATTAGTAATAGTAGTGTAAGTATT</u> GATGCCCTACGCTTTAGTAT
		R-loop3 + 200	ACTTAATGCAACTCCTAATACAGT
	1	F-loop3 – 200	ATTAGAAGATATAAAGGTAAA
		R-loop3asa	<u>AATACTTACACTACTATTACTAAA</u> ACCAAATCTGTAGAAGTGG
4	2	F-loop4asa	<u>TTTAGAAGTGGATTAGTAATAGTAGTGTAAGTATT</u> GGTGVGTAGTGAGTTATGTTGAT
		R-loop3 + 200	ACTTAATGCAACTCCTAATACAGT
	1	F-loop4 – 200	TAAATCCATGGAAAACCCCTCAAT
		R-loop3asa	<u>AATACTTACACTACTATTACTAAA</u> CATCGGTGTAATTGTGTTGCGAT
5	2	F-loop5asa	<u>TTTAGAAGTGGATTAGTAATAGTAGTGTAAGTATT</u> TAAAGTGGATCTGTAATAGATCAA
		R-loop6 + 200	TTACTGCTGATACTTTAATTTCAA
	1	F-loop6 – 200	GATGCCCTACGCTTTAGTATG
		R-loop5asa	<u>ACTATTACTAAATCCACTTCTAAA</u> TGCAACTCCTAATACAGTTTAAACACTTC
6	2	F-loop6asa	<u>TTTAGAAGTGGATTAGTAATAGTAGTGTAAGTATT</u> TAACTGCAGCAGTTACAAATACG
		R-loop6 + 200	TTACTGCTGATACTTTAATTTCAA
	1	F-loop6 – 200	GATGCCCTACGCTTTAGTATG
		R-loop6asa	<u>ACTATTACTAAATCCACTTCTAAA</u> TTGATCTATTACAGATCCACTTAA
7	2	F-loop7asa	<u>TTTAGAAGTGGATTAGTAATAGTAGTGTAAGTATT</u> ACTCAAAAAATGAAGCATGGAT
		R-loop6 + 200	TTACTGCTGATACTTTAATTTCAA
	1	F-loop7 – 200	CCCTACGCTTTAGTATG
		R-loop7asa	<u>ACTATTACTAAATCCACTTCTAAA</u> TTTAAATTTGTAACGTAT
8	2	F-loop8asa	<u>TTTAGAAGTGGATTAGTAATAGTAGTGTAAGTATT</u> GGATTTCTGGGGCAAGGAA
		R-loop6 + 200	TTACTGCTGATACTTTAATTTCAA
	1	F-loop7 – 200	CCCTACGCTTTAGTATG
		R-loop8asa	<u>ACTATTACTAAATCCACTTCTAAA</u> TGCTTCATTTTTTTGAGTAT
9	2	F-loop9asa	<u>TTTAGAAGTGGATTAGTAATAGTAGTGTAAGTATT</u> CAAAACAAATTACACATACAAT
		R-loop9 + 200	TAATGGTTGTGCAAATTTCAA
	1	F-loop9 – 200	GGTGCTGTAGTGAGTTATGTTGAT
		R-loop9asa	<u>ACTATTACTAAATCCACTTCTAAA</u> ATTAGCAGTTTCCTTGCCCCA
10	2	F-loop10asa	<u>TTTAGAAGTGGATTAGTAATAGTAGTGTAAGTATT</u> GGCGTTATGTATTGTGACC
		R-loop9 + 200	TAATGGTTGTGCAAATTTCAA
	1	F-loop9 – 200	GGTGCTGTAGTGAGTTATGTTGAT
		R-loop10asa	<u>ACTATTACTAAATCCACTTCTAAA</u> ACCAGTTTGGGCATTTTGGAT

Table 2. Mutagenic oligonucleotides. Underlined is the sequence of loop3 from *cry1Ab* gene.

After amplification, the two PCR products were purified using the PCR purification kit Qiagen (Qiagen, Hilden, Germany) as described by the manufacturer. The purified PCR products were annealed and used as templates in an additional PCR reaction with the forward primer of PCR1 and the reverse primer of PCR2 to amplify a 400 bp PCR-product that was used as mega-primer in the mutagenesis of *cyt1Aa* gene (Supplementary Figure S1). Conditions for these PCR reactions and purification of the final 400 bp PCR-product containing the loop3 from *cry1Ab* inserted into each loop region of *cyt1Aa* were as described above. Finally, the 400 bp PCR-products were used as mega-primers in the PCR-mutagenic reactions using Phusion polymerase (NEB) and plasmid pWF45 as template as follows: 98 °C for 30 sec followed by 35 cycles of denaturation at 98 °C for 15 sec, annealing at 55 °C for 1 min and extension at 72 °C for 5 min for loop1, loop2, loop4, loop5 and loop 6, or for 7 min for loop3, loop7, loop8, loop9 and loop10. Finally, an additional extension at 72 °C for 7 min was performed. After amplification, the PCR products were purified with PCR purification kit Qiagen (Qiagen) and treated with DpnI enzyme for 2 h at 37 °C to digest the methylated DNA and thus eliminate pWF45 template DNA. The products of these reactions were purified as above and used to transform DH5 α *E. coli* strain. Transformant cells were selected on LB plate containing 100 μ g/mL ampicillin (Amp). Plasmids were purified using Wizard plus DNA purification system from Promega (Promega, Madison WI). After DNA sequencing at facilities of the Institute of Biotechnology UNAM, the plasmids containing the *cyt1Aa*-hybrid mutant genes with the loop3 from *cry1Ab* were transformed

into the acrySTALLIFEROUS Bt 407⁻ strain as previously described³⁴. Transformants were selected in erythromycin (Erm) 10 µg/mL at 30 °C. The mutation in the selected Bt colonies was confirmed after plasmid purification using Wizard plus DNA purification system (Promega) and PCR amplification using these plasmids from Bt as templates with the forward primer of PCR1 and the reverse primer of PCR2 for each insertion (Table 2) and sequencing of PCR products.

Production of Cyt1Aa, Cry11Aa and Cry1Ab wild type and mutant proteins. Cyt1Aa, Cyt1Aa-hybrid, Cry11Aa, Cry1Ab or Cry1Ab-G439D protoxins were produced in *B. thuringiensis* 407⁻ acrySTALLIFEROUS strain transformed with wild type or mutated plasmids. Plasmid pWF45 has *cyt1Aa* gene³² or the new constructions of *cyt1Aa-hybrid* genes. Plasmid pCG6 contains *cry11Aa* gene³⁵. Plasmids pHT315-Ab and pHT315-AbG439D contain *cry1Ab* gene or *cry1Ab-G439D* mutated gene, respectively²⁴. Bt transformant strains were grown for four days at 30 °C in solid nutrient broth sporulation medium³⁶ supplemented with 10 µg/mL Erm for Cyt1Aa or 25 µg/mL Erm for Cry11Aa. Spores and crystals were washed three times with 0.3 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 8.0 by centrifugation for 10 min at 10,000 rpm at 4 °C and the pellet stored at -20 °C. The crystal inclusions of Cry11Aa, Cry1Ab and Cry1Ab-G439D were purified by centrifugation in sucrose gradients as described³⁷. Crystals of Cry1Ab and Cry1Ab-G439D proteins were solubilized in 50 mM Na₂CO₃, 0.2% β-mercaptoethanol, pH 10.5, and activated with trypsin in a mass ratio of 1:20 w/w (1 h, at 37 °C). Phenylmethylsulfonyl-fluoride (1 mM final concentration) was added to stop proteolysis.

The crystals of Cyt1Aa and crystal-like inclusions of Cyt1Aa-hybrid proteins were purified by the aqueous two-phase system as previously described³⁸. This aqueous two-phase system is constituted by phosphate bufer 40% (15 gr K₂HPO₄, 5 gr KH₂PO₄, 30 gr H₂O) and polyethylene glycol (PEG) 40% (20 gr PEG 4000, 30 gr H₂O). Each spore/crystal suspension was suspended in 0.1% Triton X-100 (0.2 gr spore/crystal, 0.2 ml 0.1% Triton X-100 v/v), one mL H₂O and 1.6 gr of PEG at 40% were added and mixed in vortex. One gr of KHPO₄ at 40% was added, and suspension was mixed again by vortex. The samples were centrifuged 1 min at 500 rpm. The crystals in the interphase were recovered and stored at 4 °C. The Cyt1A proteins were solubilized 1 h at 4 °C in 50 mM NaOH, 1 mM DTT, 1 mM PMSE, agitation at 700 rpm and centrifuged for 10 min at 10,000 rpm 4 °C. The soluble protoxins were recovered in the supernatant. Cyt1Aa protoxin was activated with trypsin 1:50 (Trypsin: Cyt1Aa) ratio (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO) w/w for 1 h at 4 °C and 650 rpm. Protein concentrations were determined by the Bradford assay and the protein profile analyzed in SDS-PAGE with 15% acrylamide.

Western blot assays. Protein samples were boiled 5 min in Laemmli sample loading bufer, loaded in SDS-PAGE, and electrotransferred onto a PVDF membrane 45 min at 350 mA (Millipore, Bedford, MA). The membrane was blocked with PBS, 0.1% Tween 20, 5% skimmed milk for 1 h with agitation. The membrane was then washed three times with PBST (PBS 0.1% Tween 20). Cyt1Aa protein was detected using the anti-Cyt1Aa polyclonal antibody (1:30000 in PBST, 1 h with agitation) washed three times with PBST and incubated with the secondary antibody coupled with horseradish peroxidase (HRP) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX) (1:30000 in PBST, 1 h with agitation), washed three times with PBST followed by incubation with luminol Sc-2048 (Santa Cruz Biotechnology) as described by the manufacturers. The membrane was visualized in the Imager 600 (Amersham, Pittsburgh, PA). Molecular mass markers used in all SDS-PAGE were Page ruler plus pre-stained protein ladder (Thermo Scientific, Waltham MA).

Expression and purification of CAD, APN1 and ALP proteins. CAD and ALP from *M. sexta* larvae were previously cloned and heterologously expressed in *E. coli* cells^{17,23}. The CAD fragment (CR12) was expressed in *E. coli* ER2566 strain and ALP was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) strain (Invitrogen, Carlsbad CA), both proteins were induced with 1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and inclusion bodies were solubilized with 8 M urea solution. The CR12 peptide and ALP protein were purified through a nickel affinity column and eluted with 250 mM imidazole in PBS bufer as previously described^{17,23}.

For cloning the APN1 gene, the total RNA from 3rd instar *M. sexta* midguts was extracted using RNeasy Mini kit (Qiagen). APN1 sequence was obtained from GenBank accession number: AF123313. Primers for amplification were APN1-Rev (*Eco*RI) TAC AGA ATT CCA TGC TGC GGG ACC CGA GCT ACC GC and APN1-For (*Hind*III) TCT TAA GCT TGC TAC CAT GTT AAT GGC AAG TGT G. A PCR product of 3 kbp was amplified and digested with *Eco*I and *Hind*III restriction enzymes, cloned into pET22b vector and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells (Invitrogen). Plasmid was purified and confirmed by DNA sequencing at the facilities of Instituto de Biotecnologia-UNAM.

Transformants were grown overnight with agitation at 37 °C in 5 ml of LB broth containing 50 µg/ml Amp. One hundred µl of the overnight culture were used to inoculate 100 ml of 2xTY broth 100 µg/ml ampicillin in a 250 ml flask and incubated until an OD₆₀₀ of 0.7 was obtained. One mM IPTG was added and the culture was incubated for additional 6 h at 30 °C. The culture was centrifuged at 5000 rpm for 15 min at 4 °C and the pellet suspended in STE bufer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 8 M Urea, pH 8). After sonication (5 min on ice), and centrifugation (70,000 rpm, 30 min at 15 °C), the supernatant was recovered and subjected to affinity purification using Ni-Agarose beads (Qiagen). The column was washed with 35 mM imidazole in PBS bufer, pH 7.5, eluted with 250 mM imidazole and gradually dialyzed against PBS bufer.

ELISA binding assays. ELISA plates were coated with 0.5 µg of *M. sexta* CR12 CAD fragment corresponding to cadherin repeat 12 (CAD-CR12), APN1, or ALP in 100 µl of PBS per well over night at 4 °C. Plates were washed three times with PBS and blocked with 200 µl/well of PBS-M (PBS, 2% skim milk) for 2 h at 37 °C and washed five times with PBS. Different concentrations of Cry1Ab wild type or Cry1Ab-G439D mutant (6.25 to 100 nM) in a total 100 µl volume of PBST (PBS + 0.1% Tween 20.) for 1 h at 37 °C. The unbound toxins were removed by four washes with PBST. The bound toxins were detected using 100 µl PBST bufer containing rabbit

anti-Cry1Ab (1: 10,000) antibody for 1 h at 37°C. After three washings with PBST, we added 100 µl of PBST containing the anti-rabbit conjugated with HRP antibody for 1 h at 37°C. Finally, three washes with PBST were performed and each well of the plates were incubated with 100 µl of substrate mixture (6 mg/ml *o*-phenylenediamine (Sigma) and 10 µl H₂O₂ in 0.1 M phosphate bufer). Reaction was stopped by adding 50 µl of 6 M HCl and measured at OD 490 nm using an ELISA micro plate reader. Each experiment was performed in duplicate with a total of six repetitions.

Binding of hybrid-Cyt1Aa toxins to CAD, APN1, or ALP was also analyzed. ELISA plates were coated with 0.5 µg of the each receptor as described above and incubated with Cyt1Aa or hybrid-Cyt1Aa (50 nM) in a total 100 µl volume of PBST for 1 h at 37°C. The unbound toxins were removed as above and the bound toxins were detected using 100 µl PBST bufer containing rabbit anti-Cyt1Aa (1:4,000) antibody for 1 h at 37°C. After three washings with PBST, 100 µl of PBST containing the anti-rabbit HRP-conjugated antibody was added and incubated for 1 h at 37°C. Finally, plates were washed and reveled as described above. Each experiment was performed in duplicate with a total of six repetitions for each hybrid-Cyt1Aa toxin.

Insect bioassays. *Aedes aegypti*, *M. sexta* and *P. xylostella* insects were reared at Instituto de Biotecnologia facilities, at 28°C, 75% humidity, with a 12 h: 12 h, light: dark, photoperiod. Bioassays against *A. aegypti* were performed with different concentrations (100 to 10000 ng/ml) of spore/crystal suspensions of Cyt1Aa or hybrid-Cyt1Aa against 10 early 3th-instar larvae in 10 ml of dechlorinated water. Bioassays with soluble protoxin proteins were also performed using the same concentrations as described above in 1 ml water and 10 first-instar larvae. Negative control (dechlorinated water) was included in the bioassay. Larvae viability was examined after 24 and 48 h. The mean lethal concentration (LC₅₀) was determined by Probit analysis (Polo-Plus LeOra Software) using statistical parameters using data obtained in triplicate from three independent assays.

Toxicity bioassays against *M. sexta* neonate larvae or *P. xylostella* third instar larvae were performed by the surface contamination method in 24 well plates with artificial diet. The toxin solution was poured on the diet surface and allowed to dry. Larvae were placed on the dried diet surface and the mortality was monitored after 7 and 15 days. Twenty-four larvae were used per toxin concentration in triplicate.

The evaluation of synergism between wild type Cyt1Aa and Cry11Aa proteins was done as previously described^{26,39}. The synergism was analyzed using three different protein ratios of Cyt1Aa:Cry11Aa (1:1, 1.3 and 1:5 in a final total protein concentration of 50 ng). The theoretical toxicity of each ratio mixture was evaluated according to Tabashnik's equation³⁹, assuming a simple additive edect. The synergism factor (SF) was calculated by dividing the theoretical toxicity by the observed toxicity of the mixture in bioassays. SF values >1 indicates synergism as previously described³⁹.

The synergism among Cyt1Aa-hybrid proteins and Cry11Aa was evaluated as described before²⁶. Briefly, we used the formula $S_{(ab)EXP} = S_{(a)OBS} \times S_{(b)OBS}$ where $S_{(ab)EXP}$ is the proportion of larvae expected to survive to the exposure of a mixture of toxins *a* and *b*, $S_{(a)OBS}$ and $S_{(b)OBS}$ are the observed proportion of larvae that survived to the exposure to toxin *a* or toxin *b*, respectively. Ten larvae were used per toxin concentration and per mixture of toxins. Mortality was analyzed after 24 h. The expected mortality for larvae that were exposed to the mixture of toxins *a* and *b* was calculated as $(1 - S_{(ab)EXP}) \times 100\%$ and the expected numbers of dead and live larvae were calculated by multiplying the expected mortality and survival rates by the sample size used when each toxin was tested separately. These assays were done in triplicate. Finally the Fisher's exact test was used to determine if a significant difference occurred between observe and expected mortality data.

Hemolysis assays. These assays were done as previously described⁴⁰. Rabbit red blood cells were washed three times in bufer A (0.1 M dextrose, 0.07 M NaCl, 0.02 M sodium citrate, 0.002 M citrate, pH 7.4) and diluted to 2×10^8 cells/ml in bufer A. Samples containing 20 µl of washed blood cells and Cyt1Aa toxin (20–1200 ng) in a final volume of 200 µl of bufer A were incubated at 37°C for 30 min in 96 wells microtiter plates. The supernatants were collected in a new microtiter plate after centrifugation at 2,500-x g for 5 min at 4°C and hemolytic activity was quantified by measuring the absorbance of the supernatant at 405 nm. Positive control showing 100% hemolysis was defined after incubation of the same volume of rabbit red blood cells with dechlorinated H₂O. Negative controls were red blood cells incubated with bufer A. These assays were performed three times in triplicate each time. A *t*-test was performed using the statistical program GraphPad Prism.

References

- Pardo-López, L., Soberón, M. & Bravo, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 3–22 (2013).
- James, C. 20th Anniversary (1996 to 2015) of the Global Commercialization of Biotech Crops and Biotech Crop Highlights in 2015. *ISAAA Brief No. 51*. ISAAA: Ithaca, NY (2015).
- Soberón, M., López-Díaz, J. A. & Bravo, A. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides*. **41**, 87–93 (2013).
- Porcar, M., Grenier, A.-M., Federici, B. & Rahbe, Y. Edects of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins on the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 4897–4900 (2009).
- Pal, N., Yamamoto, T., King, G. F., Waite, C. & Bonning, B. Aphicidal efficacy of scorpion and spider derived neurotoxins. *Toxicon*. **70**, 114–122 (2013).
- Federici, B. A. & Bauer, L. S. Cyt1Aa protein of *Bacillus thuringiensis* is toxic to the cottonwood leaf beetle, *Chrysomela scripta*, and suppresses high levels of resistance to Cry3Aa. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4368–4371 (1998).
- Stockhoé, B. & Conlan, C. Controlling hemipteran insects with *Bacillus thuringiensis* US patent 5723440 (1998).
- Wellman-Desbiens, E. & Cote, J.-C. 2005 Development of *Bacillus thuringiensis*-based assay on *Lygus hesperus*. *J. Econ. Entomol.* **98**, 1469–1479 (2013).
- van Frankenhuyzen, K. Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. *J. Invertebr. Pathol.* **114**, 76–85 (2013).
- van Frankenhuyzen, K. & Tonon, A. Activity of *Bacillus thuringiensis* Cyt1Ba crystal protein against hymenopteran forest pests. *J. Invertebr. Pathol.* **113**, 160–162 (2013).

11. Pérez, C. *et al.* Bti Cry11Aa and Cyt1Aa toxins interactions support the synergism-model that Cyt1Aa functions as membrane-bound receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 18303–18308 (2005).
12. Cantón, P. E., Reyes, E. Z., RuízdeEscudero, I., Bravo, A. & Soberon, M. Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. *Peptides*. **32**, 595–600 (2011).
13. Wirth, M., Georghiou, G. P. & Federici, B. A. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **9**, 10536–10540 (1997).
14. Li, J., Koni, P. A. & Ellar, D. J. Structure of the mosquitocidal deltaendotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* ssp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J. Mol. Biol.* **257**, 129–52 (1996).
15. Knowles, B. H. *et al.* A cytolytic delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* **244**, 259–262 (1989).
16. Butko, P. Cytolytic toxin Cyt1Aa and its mechanism of membrane damage: data and hypothesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2415–2422 (2003).
17. Pacheco, S. *et al.* Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a “ping-pong” binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. *J. Biol. Chem.* **284**, 32750–32757 (2009).
18. Gomez, I., Dean, D. H., Bravo, A. & Soberon, M. Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: Two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R1 receptor interact with loops α -8 and 2 in domain II of Cyt1Ab toxin. *Biochemistry*. **42**, 10482–10489 (2003).
19. Rajamohan, F., Alzate, O., Cotrill, J. A., Curtiss, A. & Dean, D. H. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: mutations at domain II of Cry1Ab enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14338–14343 (1996).
20. Liu, X. S. & Dean, D. H. Redesigning *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin into a mosquito toxin. *Prot. Eng. Design. Selec.* **19**, 107–111 (2006).
21. Shao, E. *et al.* Loop replacements with gut-binding peptides in Cry1Ab domain II enhanced toxicity against the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal). *Scientific Rep.* **6**, 20106 (2016).
22. Chougule, N. P. *et al.* Retargeting of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cyt2Aa against hemipteran insect pest. *Procs. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 8465–8470 (2013).
23. Flores-Escobar, B., Rodríguez-Magadan, H., Bravo, A., Soberon, M. & Gomez, I. *Manduca sexta* aminopeptidase-N and alkaline phosphatase have a differential role in the mode of action of Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 4543–4550 (2013).
24. Rodríguez-Almazán, C. *et al.* Dominant negative mutants of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin function as anti-toxins: Demonstration of the role of oligomerization in toxicity. *PLoS ONE*. **4**, e5545 (2009).
25. Cohen, S. *et al.* Cyt1Aa toxin: crystal structure reveals implications for its membrane-perforating function. *J. Mol. Biol.* **413**, 804–814 (2011).
26. Fernández-Luna, M. T. *et al.* Single-concentration tests show synergism among *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins against the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus*. *J. Invertebr. Pathol.* **10**, 231–233 (2010).
27. Canton, P. E., López-Días, J. A., Gill, S. S., Bravo, A. & Soberon, M. Membrane binding and oligomer membrane insertion are necessary but insufficient for *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa toxicity. *Peptides*. **53**, 286–291 (2014).
28. López-Díaz, J. A., Cantón, P. E., Gill, S. S., Soberón, M. & Bravo, A. Oligomerization is a key step in Cyt1Aa membrane insertion and toxicity but not necessary to synergize Cry11Aa toxicity in *Aedes aegypti* larvae. *Environ. Microbiol.* **155**, 3030–3039 (2013).
29. Thomas, W. E. & Ellar, D. J. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* insecticidal δ -endotoxin. *FEBS Lett.* **154**, 362–368 (1983).
30. Promdonkoy, B. & Ellar, D. J. Membrane pore architecture of a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* **350**, 275–282 (2000).
31. Manceva, S. D., Pustay-Carey, M. & Butko, P. Effect of pH and ionic strength on the cytolytic toxin Cyt1Aa fluorescence spectroscopy study. *Biochim. Biophys. Acta.* **1699**, 123–130 (2004).
32. Bideshi, D. K., Park, H.-W., Hice, R. H., Wirth, M. C. & Federici, B. A. Highly effective broad spectrum chimeric larvicide that targets vector mosquitoes using a lipophilic protein. *Sci. Rep.* **7**(1), 11282 (2017).
33. Wu, D., Johnson, J. J. & Federici, B. A. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIV proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Mol. Microbiol.* **13**, 965–972 (1994).
34. Arantes, O. & Lereclus, D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene*. **108**, 115–119 (1991).
35. Chang, C., Yu, Y. M., Dai, S. M., Law, S. K. & Gill, S. S. High-level *cryIVD* and *cytA* gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 815–821 (1993).
36. Schaefer, P., Millet, J. & Aubert, J.-P. Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**, 704–711 (1965).
37. Thomas, W. E. & Ellar, D. J. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal deltaendotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell Sci.* **60**, 181–197 (1983a).
38. Güereca, L., Bravo, A. & Quintero, R. Design of an aqueous two-phase system for the purification of ICP from *Bacillus thuringiensis*. *Process Biochem.* **29**, 181–185 (1994).
39. Tabashnik, B. E. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3343–3346 (1992).
40. Rodríguez-Almazán, C. *et al.* The amino- and carboxyl-terminal fragments of the *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa toxin have differential roles on toxin oligomerization and pore formation. *Biochemistry*. **50**, 388–396 (2011).

Acknowledgements

We thank Lizbeth Cabrera, for her technical assistance. This work was supported in part by PAPIIT-DGAPA IN201016, CONACyT Fronteras de la Ciencia 008, CONACyT 221200. MCTQ acknowledges CONACyT for her PhD fellowship.

Author Contributions

M.C.T.Q., I.G., S.P., J.S., H.F., J.O., and G.M. contributed to data collection. M.S. and A.B. conceived and designed the work. A.B. Drafted the article.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22740-9>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

Engineering *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa toxin specificity from dipteran to lepidopteran toxicity

Mary-Carmen Torres-Quintero, Isabel Gómez, Sabino Pacheco, Jorge Sánchez,

Humberto Flores, Joel Osuna, Gretel Mendoza, Mario Soberón, Alejandra Bravo*.

Figure S1. Strategy used for construction of hybrid-Cyt1Aa variants

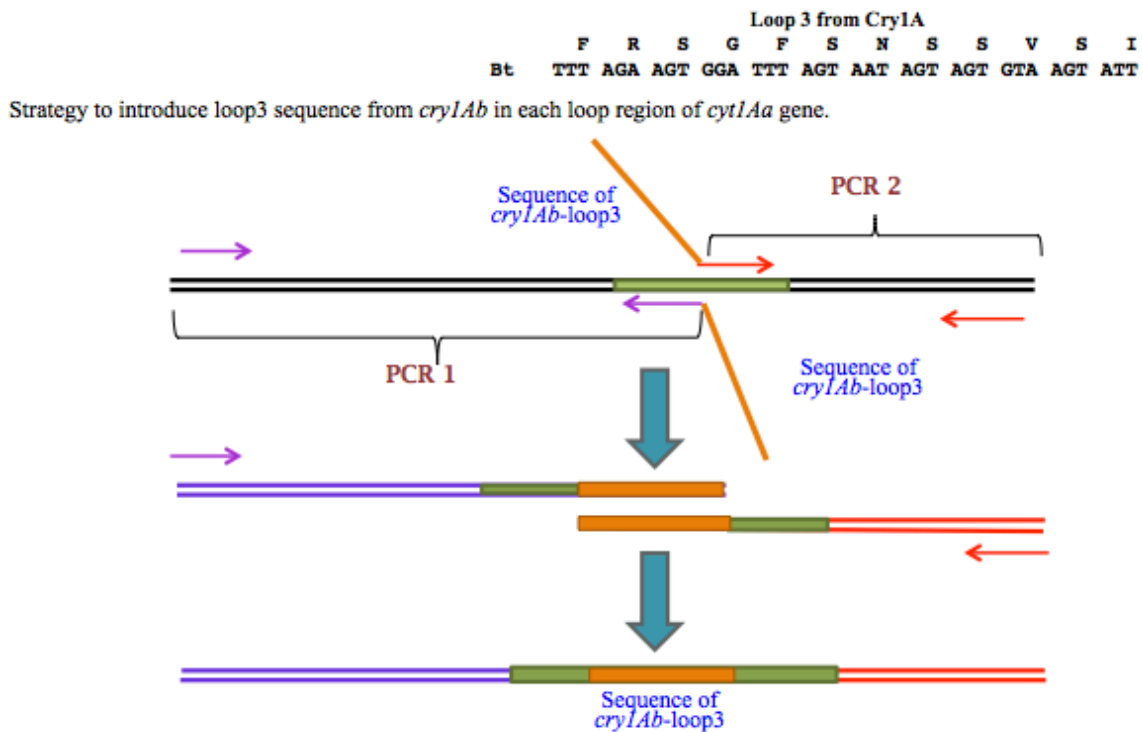


Figure S2. Effect of Cyt1Aa or hybrid-Cyt1Aa variants on *Manduca sexta* larvae.

Analysis after seven days of treatment with the Cyt1Aa toxins showing that the larvae treated with hybrid-Cyt1Aa variants (CytL3-loop6, CytL3-loop7 or CytL3-loop9) had a pale color and showed reduced size in comparison with the water control.

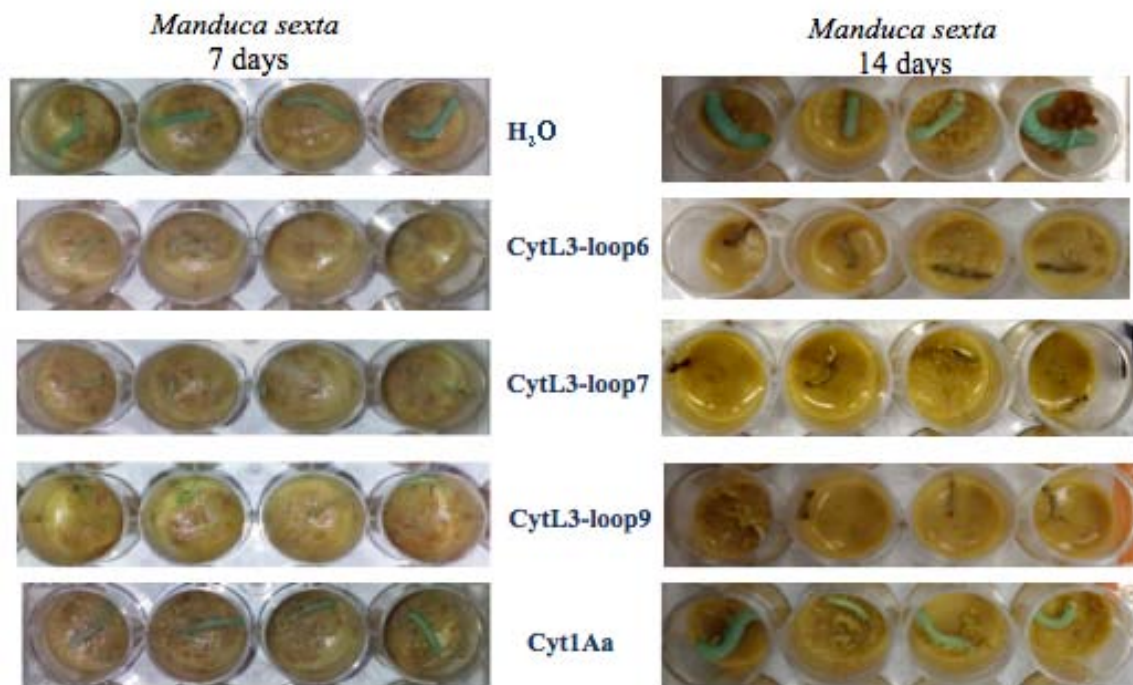


Figure S3. Superposition of three dimensional structures of Cyt1Aa and Cyt2Aa showing the selected loops for insertion of the different peptides.

Ribbons in pink color corresponds to Cyt2Aa structure (1CBY) and ribbons in light blue color corresponds to Cyt1Aa (3RON).

