

Incremento por métodos biotecnológicos del espectro de acción de la toxina insecticida Cry1Ac1 de *Bacillus thuringiensis*

✉ Camilo Ayra, Lianet Rodríguez, Damián Trujillo, Yanileysis Fernández, Milagros Ponce, Ivis Morán, Pilar Téllez

Laboratorio Biotecnología Ambiental, División Plantas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa CP 10600, AP 6162, La Habana, Cuba
E-mail: camilo.ayra@cigb.edu.cu

REPORTE

RESUMEN

En este estudio se obtuvo y caracterizó la toxina híbrida mutada CryAAC-R₄₂₃S, la cual contiene dos mutaciones que incrementan de manera independiente la actividad insecticida de la toxina salvaje formadora de poros Cry1Ac1 de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD73. Los dominios I y II de CryAAC-R₄₂₃S son de Cry1Ac1, mientras que el dominio III es de la toxina Cry1Ca1 de *B. thuringiensis* var. *aizawai* HD133. Además, el residuo de arginina en la posición 423 (R₄₂₃) se ha cambiado por serina. Mediante el uso de herramientas bioinformáticas se obtuvo un modelo para la estructura 3D de Cry1Ac1 y se predijeron las consecuencias estructurales de la mutación R₄₂₃S. El Análisis del Modo Normal sobre las variantes salvaje y R₄₂₃S encontró un incremento en la flexibilidad del lazo expuesto β7/β8 del dominio II de Cry1Ac1-R₄₂₃S, probablemente como consecuencia de la mutación. La forma purificada por FPLC de CryAAC-R₄₂₃S se obtuvo y utilizó para los análisis de función. El ensayo de oligomerización demostró que la mutación R₄₂₃S incrementa la velocidad de formación de un intermediario pre-poro oligomérico (~240 kDa), el cual es considerado como un paso importante en la ruta tóxica de este tipo de toxinas. En los bioensayos, CryAAC-R₄₂₃S fue tóxica contra cinco especies de lepidópteros, que son importantes plagas agrícolas en Cuba y en la región. Como consecuencia, la nueva toxina pudiera ser incorporada como un nuevo insecticida, ya sea en Bt-aerosoles o Bt-plantas para apoyar las prácticas agrícolas actuales de manejo integrado de estas plagas.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, CryAAC-R₄₂₃S, oligomerización, Análisis de modo normal, *Spodoptera frugiperda*

Introducción

La toxina formadora de poros Cry1Ac1 de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 es un componente importante en varias formulaciones bioinsecticidas (Dipel®, Thuricide®) y en los eventos transgénicos comerciales BollGard I® y Bt Xtra® de los cultivos del algodón (*Gossypium hirsutum* L.) y maíz (*Zea mays* L.), respectivamente [1, 2]. Cry1Ac1 se ha estudiado intensamente por su elevada potencia insecticida contra varias plagas polífagas del orden Lepidoptera. Como miembro de la familia de proteínas Cry, está compuesta por tres dominios estructurales que participan de manera diferente durante la ruta tóxica [3].

El dominio I está constituido por un grupo de siete hélices-α anfipáticas, con la hélice-α cinco en el centro. La función de este dominio se ha asociado con procesos de formación de poros en vesículas y balsas lipídicas.

El dominio II consiste en tres láminas-β antiparalelas dispuestas en una topología típica de llave griega. Este dominio se ha asociado con el proceso de reconocimiento y de unión al receptor en las microvellosidades del epitelio intestinal, y más recientemente, a la formación de la estructura oligomérica pre-poro [4].

El dominio III consta de dos láminas-β plegadas con una conformación de láminas-β intercaladas, y al parecer contiene los determinantes de la especificidad por el insecto "diana". El intercambio del dominio III entre diferentes toxinas Cry ha motivado la construcción de proteínas quiméricas con un mayor espectro de acción y actividad insecticida [5-7]. Hasta la fecha se conocen dos eventos diferentes de mutaciones que potencian la actividad insecticida de

Cry1Ac1: 1) la sustitución del residuo de arginina 423 por un residuo de serina (R₄₂₃S) en el dominio II [8], que incrementa la toxicidad de Cry1Ac1 contra larvas de *Mamestra brassicae*; y 2) la sustitución del dominio III por el correspondiente en la proteína Cry1Ca1 de *B. thuringiensis* var. *aizawai* HD-133 [6], que resultó en la toxina quimérica CryAAC (1Ac/1Ca) de mayor espectro de acción.

El objetivo del siguiente trabajo fue la obtención y análisis funcional de la proteína quimérica CryAAC-R₄₂₃S, que contiene ambas mutaciones en su estructura. Además, la mutación R₄₂₃S fue investigada mediante Análisis del Modo Normal (AMN). La potencia insecticida de la nueva toxina CryAAC-R₄₂₃S contra cinco especies de lepidópteros que constituyen plagas agrícolas, fue determinada mediante bioensayos.

Resultados y discusión

Mediante el uso de herramientas bioinformáticas y de biología molecular, se diseñaron e introdujeron mutaciones en la secuencia aminoacídica de Cry1Ac1 para obtener una nueva toxina con mayor espectro de acción. La estrategia seguida consistió en: I) Modelación de la estructura 3D de Cry1Ac1, y AMN de Cry1Ac1 y la variante R₄₂₃S; II) Construcción mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de fragmentos superpuestos y mutagénesis sitio-específica del gen que codifica para la proteína quimérica CryAAC-R₄₂₃S; III) Expresión recombinante, purificación mediante FPLC y análisis funcional de la nueva proteína quimérica; IV) Determinación del espectro de acción y la potencia

1. Navon A. Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. En: P. F. Entwistle, JS Cory, MJ Bailey, S Higgs (eds.), *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice. John Wiley & Sons: New York (1993). pp. 125-46.

2. James C. Situación global de los cultivos transgénicos/GM comercializados: 2006. ISAAA Brief 2007, 35. <http://www.isaaa.org/> (activo septiembre 2007)

3. Prieto DL, Vázquez RI, Ayra-Pardo C, de la Riva GA. *Bacillus thuringiensis*: from biodiversity to biotechnology. *J Ind Microbiol Biotechnol* (1997);19:202-19.

4. Herrero S, González-Cabrera J, Ferré J, Bakker PL, de Maagd RA. Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. *Biochem J* (2004);384:507-13.

5. Vázquez R, Fernández A, Ayra-Pardo C, González-Cabrera J. Biochemical characterization of the third domain from *Bacillus thuringiensis* toxins. *Biochem Mol Biol Intern* (1998);5:1011-20.

6. de Maagd RA, Weemen-Hendriks M, Stiekema W, Bosch D. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. *Appl Environ Microbiol* (2000);66(4):1559-63.

7. Karlova R, Weemen-Hendriks M, Naimov S, Ceron J, Dukandjiev S, de Maagd RA. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac domain III enhances activity against *Heliothis virescens* in some, but not all Cry1-Cry1Ac hybrids. *J Invertebr Pathol* (2005);88(2):169-72.

✉ Autor de correspondencia

insecticida de CryAAC-R₄₂₃S mediante bioensayos y análisis Probit.

Análisis estructural de la toxina Cry1Ac1 y la variante mutada R₄₂₃S

El alineamiento entre las secuencias aminoacídicas de las toxinas Cry1Aa1 (PDB: 1CIY) y Cry1Ac1 permitió construir un modelo para la estructura 3D de esta última, que correspondió con los residuos del 15 al 620 de Cry1Ac1 (Figura 1A). La alta similitud encontrada (82%) aporta una alta confiabilidad al modelo 3D. La comparación entre la estructura de la toxina Cry1Aa1 obtenida por difracción de rayos X (DRX) y el modelo 3D de Cry1Ac1, indica una correspondencia total con el modelo general descrito para la familia de las proteínas Cry: una estructura $\alpha+\beta$ compuesta por tres dominios [3]. El residuo de arginina 423 (R₄₂₃) se encuentra en el lazo $\beta 9/\beta 10$ del dominio II y su sustitución por serina (S) incrementa la actividad biológica de Cry1Ac1. Según nuestro modelo, las interacciones fundamentales de R₄₂₃ ocurren con los residuos T₃₉₂ y S₃₉₄ del lazo expuesto $\beta 7/\beta 8$ (Figura 1B). La sustitución R₄₂₃S tendría como consecuencias sobre el lazo $\beta 7/\beta 8$ la pérdida de dos puentes de hidrógeno y una reducción en la interacción estérica producto de una disminución del tamaño de la cadena lateral.

El estudio de dinámica molecular mediante el AMN permitió predecir la flexibilidad de cada residuo en la toxina salvaje Cry1Ac1 y la variante mutante Cry1Ac1-R₄₂₃S (Figura 2). Según esta figura, la sustitución R₄₂₃S incrementó considerablemente la flexibilidad del lazo $\beta 7/\beta 8$ de la toxina Cry1Ac1, con un pico que tiene en su centro al residuo S₃₉₄. La flexibilidad del resto de los residuos no se afectó por la mutación R₄₂₃S. Este resultado aporta novedad a los resultados finales, ya que por primera vez se utiliza el AMN para predecir los efectos de una mutación en una toxina Cry. La importancia del lazo $\beta 7/\beta 8$ para la actividad insecticida de las proteínas Cry no había sido informado con anterioridad [9, 10].

Obtención de la toxina CryAAC-R₄₂₃S y ensayo de oligomerización *in vitro*

El dominio III de las toxinas Cry1 es determinante para la especificidad, y el intercambio de esta región entre miembros de la familia influye en el espectro de acción [5]. Para ampliar el rango de acción de Cry1Ac1, el dominio III fue sustituido por el dominio correspondiente en la toxina Cry1Ca1 mediante una reacción de PCR

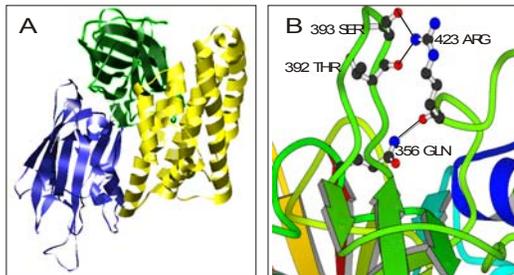


Figura 1. A- Modelo para la estructura 3D de Cry1Ac1 (dominio I: amarillo, dominio II: azul y dominio III: verde). B- modelación del residuo R₄₂₃ y de sus enlaces fundamentales en la estructura 3D de Cry1Ac1.

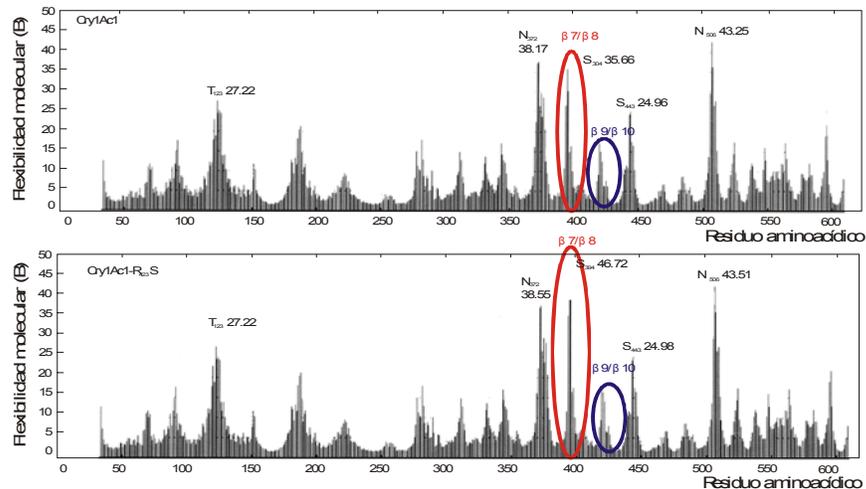


Figura 2. Valores de flexibilidad molecular (B) calculados para cada residuo aminoacídico de las toxinas Cry1Ac1 y Cry1Ac1-R₄₂₃S. En la figura se indican los residuos que centran las regiones de mayor flexibilidad con sus valores de B. También aparecen los lazos $\beta 7/\beta 8$ y $\beta 9/\beta 10$ que están encerrados en elipses de color rojo y azul, respectivamente.

utilizando fragmentos sobrelapados. La mutación R₄₂₃S se introdujo en la toxina híbrida CryAAC por mutagénesis sitio-específica. Se diseñaron los cebadores y se obtuvieron los correspondientes productos de PCR y mutagénesis, que fueron clonados en un vector binario para la expresión en *B. thuringiensis var israelensis*. La construcción genética portadora del gen *cryAAC-R₄₂₃S* fue introducida por electroporación en la cepa IPS-78/11 de *B. thuringiensis*. La formación de un cristal parasporeal en los transformantes CryAAC-R₄₂₃S fue verificada por microscopía de contraste de fase y microscopía electrónica de transmisión. La proteína CryAAC-R₄₂₃S fue purificada por cromatografía de intercambio aniónico (AEC) y se caracterizó por electroforesis desnaturizante en geles de poliácridamida SDS-PAGE al 12% (Figura 3A). El grado de pureza de la preparación final se estimó entre 92-95% mediante análisis densitométrico.

Este es el primer reporte que refiere la construcción y expresión recombinante de la toxina quimérica CryAAC-R₄₂₃S y el procedimiento para su purificación [9, 10]. Las proteínas Cry se consideran toxinas formadoras de poros, por lo que la formación del oligómero pre-poro ocupa un lugar determinante en la ruta tóxica. La figura 3B muestra el resultado del ensayo de cinética de oligomerización *in vitro*, en el que se demuestra que la mutación R₄₂₃S en CryAAC incrementa la velocidad de formación del intermediario oligomérico pre-poro. Este resultado aporta un elemento importante y de gran novedad en los resultados finales, ya que demuestra la consecuencia funcional de la mutación R₄₂₃S [10].

Potencia insecticida de CryAAC-R₄₂₃S contra larvas neonatas de cinco especies de lepidópteros plagas

La toxicidad de CryAAC-R₄₂₃S contra larvas neonatas de cinco especies de lepidópteros fue investigada en bioensayos tipo dosis-respuesta, y se estimó la concentración letal media (CL₅₀) mediante análisis Probit. Se ensayaron las especies siguientes: *Manduca*

8. Lightwood DJ, Ellar DJ, Jarrett P. Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac delta-endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol* 2000;66(12):5174-81.

9. Ayra-Pardo C, Davis P, Ellar DJ. The mutation R₄₂₃S in the *Bacillus thuringiensis* hybrid toxin CryAAC slightly increases toxicity for *Mamestra brassicae* L. *J Invertebr Pathol* 2007;95:41-7.

10. Ayra-Pardo C, Rodríguez L, Trujillo D, Ponce M, Téllez P. The mutation R₄₂₃S in the *Bacillus thuringiensis* hybrid toxin CryAAC increases *in vitro* oligomerisation and *in vivo* toxicity against *Spodoptera frugiperda*. *Biotechnología Aplicada* (2007);24:126-31.

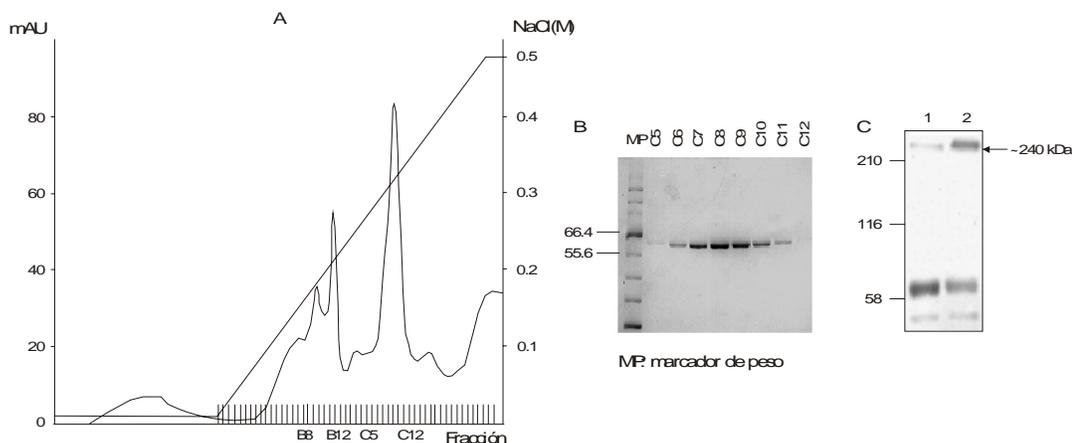


Figura 3. Obtención de la toxina CryAAC-R₄₂₃S. A- Perfil cromatográfico de la purificación de CryAAC-R₄₂₃S mediante FPLC; B- análisis de las fracciones del pico mayoritario mediante electroforesis SDS-PAGE al 12%. C- Ensayo de oligomerización: 1- CryAAC, 2- CryAAC-R₄₂₃S.

sexta, *Pieris brassicae*, *Plutella xylostella*, *M. brassicae* y *Spodoptera frugiperda*, que son importantes plagas de cultivos en la región del Caribe, como: tabaco, tomate, col, maíz, arroz, entre otros. La tabla I muestra los resultados del bioensayo. De acuerdo con estos resultados, la sustitución del dominio III de Cry1Ac1 por el de Cry1Ca1 permitió extender el espectro de acción de la primera toxina hacia plagas como *M. brassicae* y *S. frugiperda* [11].

Es importante señalar que *S. frugiperda* (nombre común: palomilla del maíz) es la plaga más importante del maíz en Cuba, donde puede llegar a afectar aproximadamente 40% de los rendimientos anuales de este cultivo. Además, los bioensayos revelaron el efecto biológico de la mutación R₄₂₃S en el dominio II de CryAAC. De acuerdo con los valores de CL₅₀ registrados, la mutación tuvo un efecto importante en la potencia insecticida de esta toxina al incrementar aproximadamente dos veces la toxicidad de CryAAC hacia *M. sexta* y *S. frugiperda* (17 ng/cm² contra 48 ng/cm² y 165 ng/cm² contra 288 ng/cm², respectivamente). Por el contrario, las potencias insecticidas de CryAAC y de la variante mutada CryAAC-R₄₂₃S, expresada en términos de la CL₅₀, no mostraron diferencias significativas (P>0.05) entre sí cuando ambas fueron ensayadas contra larvas neonatas de *P. brassicae* y *P. xylostella*. En estos casos, la actividad de ambas toxinas fue incluso inferior a la mostrada por la toxina parental Cry1Ac1, lo que sugiere un compromiso entre especialización y espectro de acción.

Se ha reportado para algunas toxinas Cry que los dominios II y III participan de manera conjunta durante la etapa de reconocimiento y unión al receptor en la membrana plasmática [3]. La sustitución del dominio III de Cry1Ac1 en CryAAC y CryAAC-R₄₂₃S afectó la toxicidad contra *P. brassicae* y *P. xylostella*, lo que sugiere la participación de este dominio en la actividad insecticida contra estos insectos.

Tabla 1. Valores de CL₅₀ (ng/cm²) de las toxinas quiméricas y sus parentales determinados en bioensayos contra larvas neonatas de cinco especies de lepidópteros)

Insecto	Cry1Ac1	Cry1Ca1	CryAAC	CryAAC-R ₄₂₃ S
<i>M. sexta</i>	5(3.2-7.8) ^a	19.1(9.4-33)	48(30.5-70.1)	17(11-25)
<i>P. brassicae</i>	9(5.57-14.2)	382(249-544)	50.2(34.9-72.9)	44(31.1-67.8)
<i>P. xylostella</i>	15(7.1-22)	112(88-170)	40.2(25-69)	38(19-63)
<i>M. brassicae</i>	N.T. ^b	581(480-748)	1280(952-2000)	1098(839-1609)
<i>S. frugiperda</i>	N.T.	N.T.	288(189-474)	165(117-198)

^a límites de confianza (95%).

^b no fue tóxica a valores de concentración de toxina > 3000 ng/cm².

Resumiendo, la alta actividad insecticida de CryAAC-R₄₂₃S contra las cinco especies ensayadas muestra la importancia práctica y utilidad de la nueva toxina como un insecticida capaz de controlar un amplio espectro de plagas agrícolas [9-11].

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que es posible diseñar y obtener nuevas toxinas insecticidas mediante la aplicación de herramientas de la evolución molecular acelerada (predicción por modelación y mutagénesis sitio-específica). Este trabajo es el primer reporte en el que se exponen las consecuencias estructurales de una mutación en el residuo R₄₂₃ del dominio II de Cry1Ac1 y su importancia para la actividad insecticida [9, 10]. La nueva toxina quimérica exhibe una alta actividad insecticida contra un mayor número de insectos plagas respecto a las proteínas parentales. Entre los insectos que pueden ser controlados por la nueva toxina CryAAC-R₄₂₃S está la palomilla del maíz, principal plaga del maíz en Cuba. CryAAC-R₄₂₃S pudiera ser incorporada como Bt-aerosol o Bt-planta a los programas nacionales de control integrado de plagas, como una herramienta más para la protección de cultivos como: maíz, arroz, tomate y col, también contra el ataque de los principales insectos plagas.

11. Ayra-Pardo C, Rodríguez L, Fernández Y, Téllez P. Increased activity of a hybrid Bt toxin against *Spodoptera frugiperda* larvae from a maize field in Cuba. *Biotechnología Aplicada* (2006); 23:236-9.