



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUIMICAS**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

**Análisis de la eliminación de fragmentos en el
extremo N-terminal de la toxina Cry1Ac y su
efecto en la toxicidad contra *Manduca sexta***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

**Q.F.B. RAMIRO JOSÉ GONZÁLEZ DUARTE
DIRECTOR DE TESIS: DRA. LILIANA PARDO LÓPEZ**



CUERNAVACA, MORELOS

AGOSTO 2009



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.

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a mis padres: Alma Rosa y Ramiro, pues siempre me han apoyado incondicionalmente. No tengo forma de pagarles por todo lo que me han dado, más sí de agradecerles; valorando su esfuerzo y su amor mediante mi realización como una persona respetable y útil a la sociedad.

También se lo dedico, de manera muy especial, a mi querida Verna. Por todas las cosas maravillosas que hemos compartido; por su apoyo, su paciencia y, sobre todo, por haber vivido juntos esta aventura científica.

*Behavior was fun, but I don't care,
I'm on to something else next year,
I must stick with the new frontier
Until I'm old and gray.
"Seymour Benzer's song"*

Tomado del libro de Jonathan Weiner: Time, Love, Memory: A Great Biologist and his Quest for the Origins of Behavior.

Agradecimientos

Quiero agradecerle a la Dra. Alejandra Bravo por haberme permitido formar parte de su importante grupo de investigación. El entusiasmo y la forma tan carismática con la que me habló sobre los intereses científicos de su grupo, fue el motivo por el que decidí trabajar con las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*.

A mi tutora, la Dra. Liliana Pardo le agradezco muchísimo todo su apoyo, pues siempre estuvo pendiente de mi formación académica. Los conocimientos que me transmitió y su gran amabilidad para conmigo son cosas que aprecio mucho y que he de recordar con afecto. También le agradezco inmensamente el que me enseñara la importancia de ser crítico en la ciencia.

Quiero reconocer los sabios comentarios y sugerencias del Dr. Mario Soberón, la Dra. Isabel Gómez, la Dra. Helena Porta y el Dr. Carlos Muñoz; investigadores a quien también admiro y aprecio mucho.

Reconozco también, con gran aprecio, las útiles recomendaciones técnicas del Dr. Ernesto Ortiz y las aportaciones del Dr. Daniel Segura, ambos miembros de mi comité tutorial de maestría. Por otro lado, le agradezco mucho a mi jurado de examen: Dra. Gloria Saab, Dr. Miguel Ángel Cevallos, Dr. Joel Osuna y Dr. Gerardo Corzo por su amable atención y por las correcciones a mi escrito de tesis.

Me siento muy contento por la suerte de haber hecho dos grandes amigos en el laboratorio: Luis Enrique y Fernando. Adicionalmente, agradezco la amena convivencia con mis compañeros del grupo: Leivi, Biviana, Raquel, Iván, Claudia Rodríguez, Teresa, Ángeles, Sabino, Esmeralda, Nato, Francisco, Emiliano e Iñigo. También agradezco mucho la amistad y la amabilidad del Dr. Juan Miranda y del Dr. Enrique Reynaud.

También quiero reconocer la valiosa ayuda de Sergio Blancas, Lizbeth Cabrera, Jorge Sánchez y Graciela Domínguez en el trabajo diario. Creo que ellos son una parte muy importante para el buen funcionamiento del laboratorio.

Finalmente quiero agradecer al escritor Francisco Rebolledo por sus enseñanzas literarias y por su amistad. Su taller de redacción y estilo fue una actividad estimulante y liberadora inolvidable.

ESTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN EL DEPARTAMENTO
DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGÍA DE LA UNAM BAJO LA DIRECCIÓN DE LA
DRA. LILIANA PARDO LÓPEZ

Índice

Lista de abreviaturas	7
Resumen	8
Introducción	9
Características generales de <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
Las toxinas Cry y Cyt son toxinas formadoras de poro	10
Estructura de las toxinas Cry.....	10
Mecanismo de acción de las toxinas Cry de tres dominios en insectos lepidópteros	11
Enlace al receptor en larvas de lepidópteros.....	14
Formación del pre-poro e inserción en membrana.....	15
Resistencia en insectos hacia las toxinas de Bt.....	15
Estrategias para mejorar la actividad insecticida de las toxinas Cry	18
Antecedentes	19
Procesamiento del extremo N-terminal.....	19
Modificaciones en el extremo N-terminal de toxinas Cry: una posible estrategia para mejorar la actividad insecticida	21
Hipótesis	23
Objetivo general	23
Objetivos particulares	23
Estrategia experimental	24
Materiales y métodos	27
Diseño de oligonucleótidos	27
Purificación de oligonucleótidos mediante PAGE.....	28
Ensayos de PCR.....	29
a) <i>Estrategia uno</i>	29
b) <i>Estrategia dos</i>	32
<i>PCR de ensamble</i>	36
Electroforesis de ADN	38
Purificación de plásmidos bacterianos.....	39
Purificación de ADN a partir de gel de agarosa	39
Obtención de células de <i>E.coli</i> XL1blue electrocompetentes	39
Obtención de células de <i>Bacillus thuringiensis</i> electrocompetentes.....	40
Obtención de células de <i>E. coli</i> competentes de calcio (<i>dam</i> ⁻)	40
Transformación de células electrocompetentes mediante pulso eléctrico (electroporación)	40
<i>Células XL1blue</i>	40
<i>Células de Bacillus thuringiensis acristalíferas</i>	41
Transformación de células competentes de calcio (<i>dam</i> ⁻) mediante choque térmico	41
Clonación en el vector pJET1.2/blunt (2.9 Kb)	41
Obtención del plásmido pHT315 (6.5 Kb): vector específico para <i>B. thuringiensis</i>	42
Digestión con enzimas de restricción.....	42
Ligaciones.....	43
a) <i>Estrategia uno</i>	43
b) <i>Estrategia dos</i>	44

PCR de colonia.....	45
<i>Protocolo para células de E. coli</i>	45
<i>Protocolo para células de B. thuringiensis</i>	45
Secuenciación de ADN	46
Obtención de la suspensión de espora-cristal.....	46
Cuantificación de proteína.....	47
Electroforesis de proteínas	47
Detección de proteínas mediante <i>Western blot</i>	47
Bioensayos de toxicidad en larvas de primer estadio de <i>M. sexta</i>	48
Resultados	49
Construcción de mutantes de la toxina Cry1Ac con supresiones en el extremo N-terminal	49
Obtención de los fragmentos para ligación mediante ensayos de PCR.....	51
Subclonación de los productos de PCR en el vector pJET1.2/blunt	52
Obtención del megaprimer y los fragmentos de toxina.	53
PCR de ensamble.....	53
Subclonación de los productos de PCR de ensamble en pJET1.2/blunt	54
Detección de clonas de <i>E. coli</i> positivas mediante PCR de colonia.....	55
Detección de los plásmidos construidos en la cepa acristalífera de <i>B. thuringiensis</i> transformada	56
Caracterización bioquímica de las proteínas mutantes	57
<i>Análisis de la formación de protoxina mediante SDS-PAGE</i>	57
Bioensayos.....	60
Discusión.....	61
Conclusiones.....	65
Perspectivas.....	65
Apéndice	66
1. Medios de cultivo.....	66
2. Buffers.	68
3. Otros materiales utilizados.....	69
Bibliografía.....	70

Resumen

Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* destacan entre los insecticidas biológicos utilizados en la actualidad por ser altamente específicas hacia su insecto blanco, además de ser biodegradables e inocuas para el ser humano, los demás vertebrados y las plantas. La acción primaria de las toxinas Cry consiste en la lisis de las células epiteliales del intestino medio del insecto blanco debido a la formación de poros (oligoméricos) en la membrana apical de las microvellosidades de dichas células.

Los estudios realizados en larvas del lepidóptero *Manduca sexta* han demostrado dos eventos fundamentales en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1A: 1) El procesamiento proteolítico de las toxinas Cry en el intestino medio del insecto y 2) La participación secuencial de dos receptores; primero una proteína tipo caderina y luego una aminopeptidasa anclada por GPI. Se ha propuesto que el procesamiento proteolítico del extremo N-terminal, posterior al reconocimiento con el primer receptor tipo caderina, es un paso esencial temprano en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1. Si dicho procesamiento no se lleva a cabo, se impide la oligomerización y, por tanto, la toxicidad de las proteínas. Esto quedó demostrado con el descubrimiento de cepas de insectos resistentes a toxinas Cry, en las cuales el receptor tipo caderina está alterado.

En un trabajo reciente del grupo, se reportaron toxinas Cry1A modificadas a nivel del gen (toxinas Cry1AMod). A dichas proteínas les fue eliminada una región cercana al extremo N-terminal, volviéndolas tóxicas contra insectos resistentes a las toxinas silvestres (insectos afectados en el primer receptor). En el presente trabajo, se construyeron siete plásmidos de la toxina Cry1Ac donde se eliminaron regiones cercanas al extremo N-terminal de la proteína codificada. Se realizó un análisis bioquímico y de toxicidad contra larvas de *M. sexta* de todas las construcciones. Con lo anterior se intentó delimitar la región (o regiones) dispensable(s), cercana(s) al extremo N-terminal de la proteína, que permitiera(n) mantener una toxina con actividad biológica, es decir, que fuera capaz de formar oligómero y ser tóxica contra los insectos blanco.

Solamente una de las construcciones generó una protoxina cercana a 130 kDa, pero no resultó tóxica contra *M. sexta*. La falta de producción de proteínas Cry1Ac en el resto de las cepas transformadas de *B. thuringiensis*, nos permite suponer que las remociones afectaron severamente el plegamiento y la estabilidad de las proteínas mutantes. Estos resultados sugieren que, en el caso de la toxina Cry1AcMod, ésta podría ser la mínima unidad suficiente para formar oligómero y ser tóxica contra insectos lepidópteros susceptibles y resistentes.

Introducción

La población humana ha superado los 6 000 millones de personas y está aumentando en unos 80 millones al año. En cambio, el tamaño de las zonas de cultivos agrícolas tiende a reducirse, implicando un problema de interés mundial. El crecimiento en la producción de alimentos que se necesita para atender a una población de mayor magnitud no puede proceder de la obtención de nuevas tierras para fines agrícolas, pues la mayor parte de la tierra idónea para la agricultura ya está siendo utilizada. Por consiguiente, dicho crecimiento debe provenir del incremento de los alimentos producidos por hectárea (FAO, 2003).

Se estima que anualmente un 28% de la producción de alimentos en el mundo es afectada por plagas de insectos, ya sea en el campo o durante su almacenamiento. Hasta hace unas décadas, el control de dichas plagas se basaba principalmente en el uso de insecticidas químicos que, si bien resultaron útiles, han generado una serie de efectos no deseados en el ambiente que implican la contaminación tóxica de ecosistemas, el desarrollo de resistencia en algunas plagas y la destrucción indiscriminada de especies benéficas para el entorno. Debido a lo anterior, ha sido necesaria la búsqueda de nuevas alternativas “amigables” con el ambiente para el control de plagas de importancia en agricultura y silvicultura.

Los bioinsecticidas representan una alternativa muy importante para el control de plagas de diversos cultivos. Estos agentes de control biológico poseen diversas ventajas que motivan a la investigación y el desarrollo de productos competitivos, comercializables y de bajo impacto ambiental. Entre los diferentes agentes de control biológico, las bacterias patógenas de insectos han sido las más estudiadas. Particularmente tenemos el caso de *Bacillus thuringiensis*.

Características generales de Bacillus thuringiensis

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es una bacteria Gram positiva, aerobia estricta que durante su ciclo de vida presenta dos fases principales: la fase de crecimiento vegetativo en donde las bacterias se duplican por bipartición cada 30-90 min dependiendo del medio de cultivo y la fase de esporulación, la cual es un programa de diferenciación de bacteria a espora. El programa de diferenciación consta de siete estadios y se dispara cuando la bacteria se encuentra en limitación de nutrientes. La espora es una forma de vida latente que puede permanecer en el ambiente por periodos de tiempo muy largos (años) en ausencia de humedad y de nutrientes. Cuando la espora se encuentra de nuevo en un medio rico que contenga los nutrientes necesarios, puede germinar para comenzar de nuevo el crecimiento vegetativo (Soberón y Bravo, 2001).

Bt se caracteriza por contener un cuerpo paraesporal conocido como cristal, el cual es de naturaleza proteica y tiene propiedades insecticidas. Está constituido

por proteínas denominadas δ -endotoxinas, también conocidas como proteínas Cry y Cyt. Se sabe que las proteínas Cry son selectivamente tóxicas para los órdenes de insectos *Lepidoptera* (mariposas), *Coleoptera* (escarabajos), *Hymenoptera* (hormigas) y *Diptera* (mosquitos), inclusive contra nemátodos, mientras que las toxinas Cyt sólo son activas contra *Diptera*.

Estas toxinas tienen la ventaja de ser completamente biodegradables e inocuas para el ser humano, los demás vertebrados y las plantas. Debido a lo anterior, *Bt* ofrece una alternativa viable para el control de plagas de insectos de importancia en agricultura y en silvicultura, así como de vectores de enfermedades en humanos (Bravo *et al.*, 2005). De hecho, se ha estimado que el 2% del mercado mundial de pesticidas se satisface con biopesticidas, en el que *Bt* domina el 95% de las ventas (Schnepf, 1998).

Las toxinas Cry y Cyt son toxinas formadoras de poro

Las toxinas Cry y Cyt pertenecen a una clase de toxinas bacterianas conocidas como toxinas formadoras de poro (PFT por sus siglas en inglés) que se secretan como proteínas solubles en agua y que desarrollan cambios conformacionales enfocados a su inserción en las membranas celulares del hospedero. Hay dos grupos principales de PFT:

- 1) Toxinas hélice- α : en ellas las regiones α -hélice forman el poro transmembranal.
- 2) Toxinas barril- β : se insertan en la membrana formando un barril- β compuesto de ganchos de hojas- β de cada monómero (Parker y Fiel, 2005).

La primera clase de PFT incluye toxinas como la de la difteria, las colicinas y también las toxinas Cry.

En general, las bacterias productoras de PFT secretan sus toxinas y éstas interactúan con receptores específicos localizados en la superficie de las células del hospedero. En la mayoría de los casos las PFT se activan por proteasas del hospedero después del enlace con el receptor, induciendo la formación de una estructura oligomérica que es competente para la inserción.

Estructura de las toxinas Cry

La estructura terciaria de varias toxinas Cry se ha determinado por cristalografía de rayos X, mostrando que todas estas estructuras presentan un alto grado de similitud en cuanto a su organización en tres dominios (Figura 1). Lo anterior sugiere un modo similar de acción de la familia de proteínas Cry de tres dominios. El dominio N-terminal (dominio I) es un agrupamiento de siete hélices α en el cual, la hélice α_5 central es hidrofóbica y está rodeada por las otras seis

hélices anfipáticas. Este dominio es responsable de la inserción en membrana y la formación del poro. El dominio II consiste de tres hojas- β antiparalelas con regiones rizo expuestas y el dominio III es un sándwich- β (Li *et al.*, 1991; Morse *et al.*, 2001; Boonserm *et al.*, 2005).

Regiones expuestas en los dominios II y III están involucradas en la interacción con los receptores (Bravo, 2005). El dominio I comparte similitudes estructurales con otras PFTs como las colicinas la y N y la toxina diftérica, apoyando la idea de que este dominio tiene un rol formador del poro.

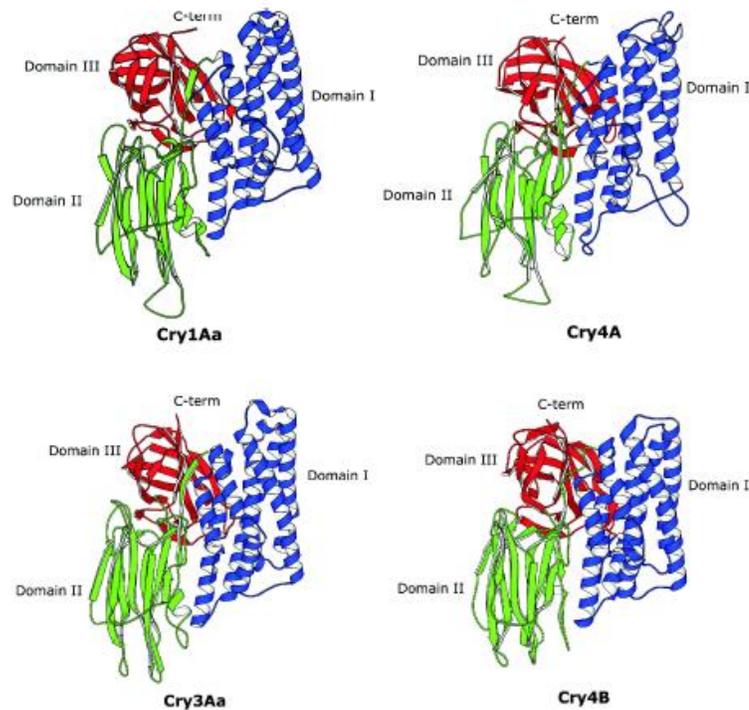


Figura 1. Representaciones esquemáticas de listón de modelos basados en homología para Cry4A y Cry4B en comparación con la estructura cristalina conocida de Cry1Aa y Cry3Aa. Se ilustra la organización en tres dominios: dominio I, agrupamiento de hélices α ; dominio II, prisma β ; dominio III, sándwich β (tomada de Boonserm *et al.*, 2005).

Meca

nismo de acción de las toxinas Cry de tres dominios en insectos lepidópteros

El mecanismo de acción de las toxinas Cry se ha caracterizado principalmente en insectos lepidópteros (Figura 3). Como se mencionó previamente, es ampliamente aceptado que la acción primaria de las toxinas Cry consiste en la lisis de las células epiteliales del intestino medio del insecto blanco debido a la formación de poros en la membrana apical de las microvellosidades de dichas células (Aronson y Shai, 2001; de Maagd *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha propuesto recientemente que la toxicidad podría estar

relacionada con un mecanismo de muerte celular, cuyo componente clave es la proteína cinasa K (PKA), después del enlace con el receptor (Zhang *et al.*, 2006).

Las proteínas Cry pasan de ser inclusiones cristalinas (protoxina) a oligómeros insertados en membrana que causan flujo descontrolado de iones y lisis celular. Las inclusiones cristalinas ingeridas por larvas susceptibles se disuelven en el ambiente alcalino del intestino, las protoxinas solubilizadas inactivas se cortan por proteasas del intestino medio generando proteínas de 60 a 65 kDa resistentes a proteasas (Bravo, 2005).

La activación de la toxina involucra la remoción proteolítica de un fragmento en el N-terminal (por ejemplo: 25 a 30 aminoácidos para toxinas Cry1 y 58 residuos para Cry3A) y aproximadamente la mitad de la proteína restante a partir del extremo C-terminal en el caso de protoxinas Cry largas. La figura 2 muestra una representación esquemática de la estructura de la protoxina Cry y sus sitios de corte por proteasas.

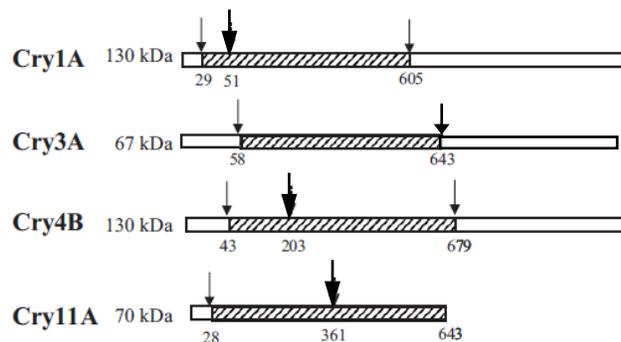


Figura 2. Longitud relativa de protoxinas Cry y posición de la digestión por proteasas. Los segmentos blancos representan la protoxina y los segmentos rayados representan la toxina activada. Las flechas pequeñas muestran los sitios de cortado de los extremos amino y carboxilo terminal de las toxinas activadas. Las flechas de punta gruesa muestran cortes intramoleculares (tomada de Bravo *et al.*, 2007).

El corte de Cry1A en el residuo 51 resulta en la pérdida de la hélice $\alpha 1$ y la formación del pre-poro. El corte de Cry4B produce dos fragmentos, uno de 18 y otro de 46 kDa, mientras que Cry11A resulta en dos fragmentos, uno de 34 y otro 32 kDa.

La toxina ya activada se enlaza a receptores específicos de la membrana de borde en cepillo, de las células epiteliales, del intestino medio del insecto (de Maagd *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2005) antes de insertarse en la membrana. La inserción de la toxina conduce a la formación de poros líticos en la microvellosidad de las membranas apicales (Aronson y Shai, 2001; Bravo *et al.*, 2005). Subsecuentemente, la lisis celular y la disrupción del epitelio del intestino medio libera el contenido celular, brindándoles a las esporas un medio óptimo para la

germinación y conduciendo a una severa septicemia y a la muerte del insecto (de Maagd *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2005).

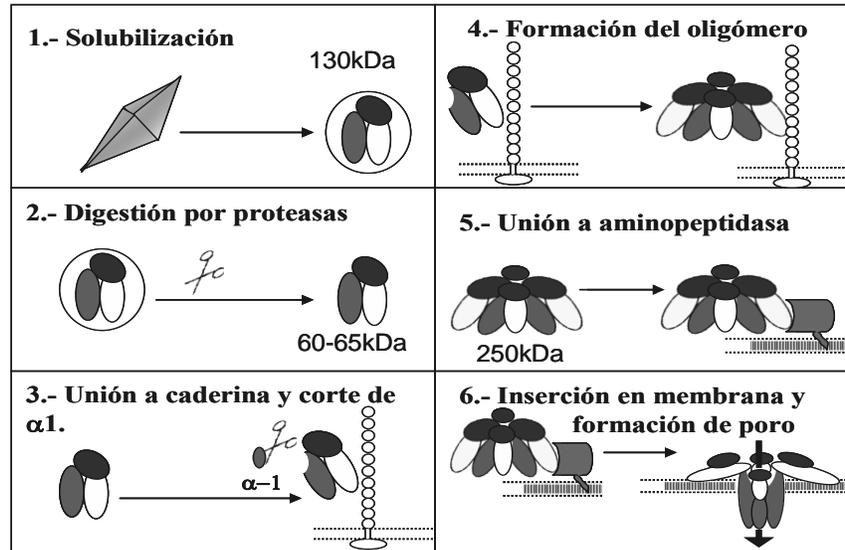


Figura 3. Un mecanismo general de acción, propuesto por nuestro laboratorio, implica los siguientes pasos:

- 1 y 2. Solubilización de los cristales y activación de la protoxina por proteasas del intestino medio, generando el monómero de la toxina.
3. Interacción del monómero con el receptor caderina de la membrana apical de las células del intestino medio (en este punto se produce el corte proteolítico de la hélice $\alpha 1$ del dominio I).
4. Formación de un oligómero por interacciones entre monómeros de toxina.
5. Interacción del oligómero con un segundo receptor tipo aminopeptidasa (APN). Movilización del receptor APN y el oligómero hacia microdominios membranales (*rafts*).
6. Mediante un cambio conformacional del oligómero se realiza la inserción de la toxina en la membrana de las células produciéndose un poro, probablemente tetramérico, activo.

Es importante resaltar que la activación de la toxina requiere del procesamiento del extremo N-terminal de la proteína. La estructura tridimensional de la protoxina Cry2Aa mostró que dos hélices α de la región N-terminal ocluían una región de la toxina involucrada en la interacción con el receptor (Morse *et al.*, 2001). También se encontró que una mutante de Cry1Ac que retuvo el extremo N-terminal, después del tratamiento con tripsina, era incapaz de formar poros en vesículas de membranas de borde en cepillo (BBMV, por sus siglas en inglés) de *M. sexta*, *in vitro*, y había disminuido severamente su actividad insecticida, *in vivo* (Bravo *et al.*, 2002). Por lo tanto, el procesamiento del extremo N-terminal de las protoxinas Cry podría desenmascarar un parche hidrofóbico en el dominio II involucrado en la interacción toxina-receptor o toxina-membrana (Bravo, 2006).

Enlace al receptor en larvas de lepidópteros

Al menos cuatro diferentes proteínas de enlace han sido descritas para las toxinas Cry1A en diferentes insectos lepidópteros: una proteína tipo caderina (CADR), una aminopeptidasa-N (APN) anclada por glucosilfosfatidil inositol (GPI), una fosfatasa alcalina anclada por GPI y un gluco-conjugado de 270 kDa (Vadlamudi *et al.*, 1995; Knight *et al.*, 1994; Jurat-Fuentes y Adang, 2004; Valaitis *et al.*, 2001). La figura 4 muestra una representación de los cuatro tipos de moléculas receptoras putativas a Cry1A que se han caracterizado.

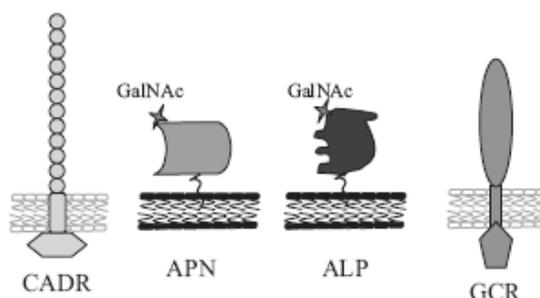


Figura 4. Moléculas receptoras de proteínas Cry1A. CADR, caderina; APN, aminopeptidasa-N; ALP, fosfatasa alcalina; GCR, gluco-conjugado de 270 kDa (tomada de Bravo *et al.*, 2007).

El rol de la interacción toxina-receptor se ha descrito particularmente bien en *M. sexta*. En este insecto al menos dos proteínas interactúan con Cry1A: una proteína CADR (denominada Bt-R1) y una APN anclada por GPI se han descrito como receptores (Vadlamudi *et al.*, 1995; Knight *et al.*, 1994). Las caderinas son proteínas transmembranales con un dominio citoplasmático y un ectodominio extracelular con varios repetidos; 12 en el caso de Bt-R1 (Vadlamudi *et al.*, 1995). El ectodominio contiene sitios de enlace a calcio, secuencias de interacción con integrinas y secuencias de enlace a caderinas. Experimentos con Resonancia Superficial de Plasmones mostraron que la afinidad de enlace de la toxina Cry1A monomérica hacia el receptor Bt-R1 de *M. sexta* estaba en el rango de 1 nM (Vadlamudi *et al.*, 1995), mientras que la de APN estaba en el rango de 100 nM (Jenkins y Dean, 2000).

La interacción de las toxinas Cry1A con el receptor Bt-R1 involucra al menos tres epítopes de enlace entre las dos moléculas. Se determinó que uno de ellos se localiza en el repetido 7 en Bt-R1 CADR y que está involucrado en el enlace a la toxina, en el asa 2 del dominio II de las toxinas Cry1A (Gómez *et al.*, 2001, 2002a). Adicionalmente, otro epítipo de enlace en Bt-R1 CADR fue identificado: el repetido 11 que interactúa con el asa $\alpha 8$ (asa $\alpha 8a$ - $\alpha 8b$) y el asa 2 del dominio II de las toxinas Cry1Ab (Gómez *et al.*, 2003). Finalmente, una tercera región en Bt-R1 CADR, el repetido 12, está involucrada en la interacción con

Cry1Ab y su toxicidad; de hecho, éste último resultó ser el más importante para la unión a la toxina (Hua *et al.*, 2004). El repetido 12 interacciona con el *loop* 3 del dominio II de Cry1Ab.

Formación del pre-poro e inserción en membrana

Como se mencionó previamente varias PFTs forman una estructura oligomérica soluble antes de la inserción en membrana. En el caso de la toxina Cry1Ab, el enlace de ésta a Bt-R1 en *M. sexta* promueve un corte proteolítico adicional en el extremo N-terminal de la toxina (hélice α 1) facilitando la formación de un pre-poro oligomérico que es importante para la inserción en la membrana y para la toxicidad (Gómez *et al.*, 2002b).

Se ha demostrado la formación de estructuras oligoméricas en las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fa y para las toxinas Cry3 (Gómez *et al.*, 2002b; Rausell *et al.*, 2004a, 2004b; Muñoz-Garay *et al.*, 2006). En todos los casos, las muestras de toxinas Cry que contenían estructuras oligoméricas correlacionaron con una alta actividad formadora de poro, en contraste con las muestras con monómero que mostraron una actividad formadora de poro marginal, lo que la hipótesis de que el oligómero es el responsable de la formación del poro.

Después de la exposición de vesículas de membranas de borde en cepillo (BBMV) a las toxinas Cry1A, dichas toxinas se encontraron asociadas a microdominios denominados balsas lipídicas (*lipid rafts*) y se reportó que la integridad de esos microdominios era esencial para la actividad formadora de poro *in vitro* de Cry1Ab (Zhuang *et al.*, 2002). Al igual que sus contrapartes en mamíferos, las balsas lipídicas de *M. sexta* están enriquecidas en colesterol, esfingolípidos y proteínas ancladas por GPI (Zhuang *et al.*, 2002). Dichos microdominios se han descrito como portales para diversos virus, bacterias y toxinas. Diferentes PFTs bacterianas interactúan con receptores localizados en balsas lipídicas, esto es un paso crucial en la oligomerización e inserción de la PFT en la membrana (Cabiaux *et al.*, 1997).

El receptor APN se ha implicado en la inserción de las toxinas Cry1A ya que su tratamiento con fosfatidilinositol fosfolipasa C, que corta el anclaje GPI de la APN, disminuyó sustancialmente los niveles de oligómero de Cry1Ab en membranas insolubles y redujo drásticamente la actividad formadora de poro de la toxina (Bravo *et al.*, 2004). Además, la incorporación de APN en bicapas lipídicas incrementó la actividad formadora de poro de Cry1Aa (Schwartz *et al.*, 1997).

Resistencia en insectos hacia las toxinas de Bt

La evolución de la resistencia hacia las toxinas de *Bt* en las plagas de insectos representa el mayor obstáculo para la continuidad en el uso exitoso de

este desarrollo amigable con el ambiente. La resistencia hacia estas toxinas puede obtenerse mediante la interferencia de alguno de los pasos involucrados en el mecanismo de acción de las proteínas Cry. El análisis del mecanismo molecular de la resistencia en insectos hacia las toxinas de *Bt* ha sido, en mayor parte, basado en el estudio de poblaciones resistentes seleccionadas bajo condiciones de laboratorio. Estos estudios podrían proporcionar conocimientos importantes que permitan el diseño racional de procedimientos necesarios para el manejo de la resistencia en el campo.

Se considera que los mecanismos de resistencia de poblaciones naturales de insectos no comprometen significativamente la salud de dichos organismos, en función de garantizar la fijación de los alelos de resistencia en la población. Por lo tanto, los alelos encontrados en poblaciones de insectos seleccionadas en laboratorio, podrían no ser necesariamente encontradas en la naturaleza, si bien, alelos encontrados en la naturaleza pueden estar presentes en líneas seleccionadas en laboratorio (Bravo y Soberón, 2005).

La selección, en laboratorio, de insectos resistentes a las toxinas de *Bt*, se ha llevado a cabo para una variedad de insectos lepidópteros de las siguientes especies: *Plodia interpunctella*, *Plutella xylostella*, *Heliothis virescens* y *Spodoptera exigua* (Ferré y Van Rie, 2002). A la fecha, dos especies de insecto plaga de cultivos (*Plutella xylostella* y *Trichoplusia ni*) han desarrollado resistencia a la toxinas Cry (aplicadas como *spray*) en el campo (Ferré y van Rie, 2002; Janmaat y Myers, 2003). Finalmente, se ha reportado que *Helicoverpa zea* ha desarrollado resistencia a cultivos de algodón transgénico (Tabashnik *et al.*, 2008).

El mecanismo más frecuente de resistencia a las toxinas Cry involucra alteraciones en el receptor que reducen su capacidad de interacción con la toxina (Ferré y van Rie, 2002).

En la mayoría de las líneas de insectos resistentes estudiadas, no hay información que permita la caracterización a nivel molecular de mutaciones que provoquen dicha resistencia a las proteínas Cry. En el caso de la línea YHD2 de *H. virescens* resistente a Cry1A seleccionada en laboratorio, se demostró que una mutación fue la responsable del 40-80% de los niveles de resistencia a Cry1A. La mutación se ubicó y se mostró estar asociada a la inserción de un retrotransposón en el gen de caderina (Gahan *et al.*, 2001). Este resultado muestra que el enlace de las toxinas Cry1A al receptor tipo caderina es un evento importante en el modo de acción de estas toxinas.

Basado en estos resultados, se ha sugerido que si las mutaciones en genes de caderina son la base primaria de la resistencia en el campo, la caracterización de alelos de caderina podría ser útil en el monitoreo de resistencia en el campo (Morin *et al.*, 2003). La caracterización de alelos de caderina en cepas derivadas del campo y de las seleccionadas en laboratorio de la plaga del algodón, gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*), reveló tres alelos de caderina que se asociaron con la resistencia en este lepidóptero (Morin *et al.*, 2003).

La figura 5 muestra las características estructurales de cuatro alelos de caderina que sufrieron mutaciones y que se han asociado a resistencia en *H. virescens* y *P. gossypiella*.

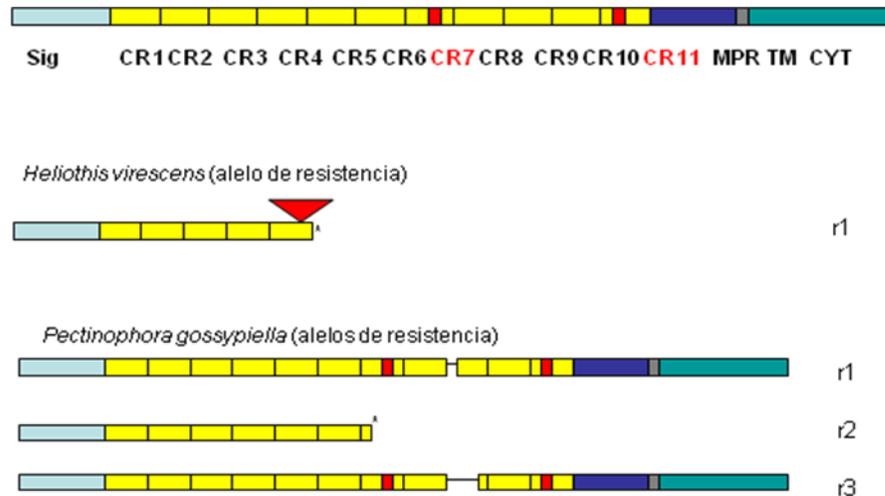


Figura 5. Estructura de los alelos de caderina implicados en la resistencia de *H. virescens* y *P. gossypiella*. Sig corresponde a la secuencia señal para exportar la proteína; CR, repetido de caderina o ectodominios repetidos; MPR, región proximal a membrana; TM, región transmembranal; CYT, dominio citosólico; *, codón de paro; triángulo, inserción del retrotransposón; líneas sólidas, supresiones. Las secciones resaltadas en CR7 y CR11 son epítomos de enlace a Cry1A ubicados en el receptor Bt-R1 (caderina) en *M. sexta* (tomada de Bravo *et al.*, 2005).

Estrategias para mejorar la actividad insecticida de las toxinas Cry

En la siguiente tabla se mencionan brevemente algunas estrategias, en nivel experimental, con las que se busca mejorar la actividad insecticida de las toxinas Cry de Bt. Algunas podrían ser útiles para contrarrestar la resistencia en insectos plaga:

Estrategia	Ejemplos	Descripción
Incremento de la actividad de la toxina Cry mediante proteínas adicionales	Inhibidores de proteasas	<ul style="list-style-type: none"> — MacIntosh <i>et al.</i>, reportó en 1990 que diversos inhibidores de serina proteasas (de origen vegetal o animal), aun en muy bajas concentraciones, incrementan la actividad insecticida de diversas toxinas Cry contra sus blancos (al ser administrada la toxina en combinación con el inhibidor de serina proteasas en la dieta). — El mecanismo de acción es desconocido pero podría involucrar la inhibición de ciertas proteasas intestinales que normalmente estarían inactivando a las toxinas Cry.
	Toxinas Cyt	<ul style="list-style-type: none"> — Las toxinas Cyt son producidas por cepas de <i>B. thuringiensis</i> activas contra larvas de mosquitos. — Se ha observado en bioensayos que las proteínas Cyt aumentan la actividad contra mosquitos de las toxinas Cry4A, Cry4B y Cry11Aa y permiten contrarrestar la resistencia de poblaciones de <i>Culex quinquefasciatus</i> resistentes a toxinas Cry (Wirth <i>et al.</i>, 1997).
	Péptido CR12	<ul style="list-style-type: none"> — El repetido 12 del receptor caderina de <i>M. sexta</i> es una región muy importante para la interacción con las toxinas Cry1A. Chen <i>et al.</i>, reportó en 2007 que la combinación de dicho péptido con toxinas Cry mostró un incremento importante en la actividad insecticida en larvas de lepidópteros (en cuya dieta se encontraba dicha combinación).
Modificaciones en el gen de la toxina Cry	Mutagénesis sitio dirigida	<ul style="list-style-type: none"> — La mayoría de las mutaciones alteran la toxicidad de las proteínas Cry, sin embargo, algunas han resultado en toxinas con mayor actividad. — Las mutantes N372A o N372G de Cry1Ab, mostraron un incremento de 8 veces en su toxicidad contra <i>Lymantria dispar</i> (Rajamohan <i>et al.</i>, 1996).
	Toxinas híbridas	<ul style="list-style-type: none"> — Mediante la sustitución del dominio III se han generado nuevas toxinas con un espectro más amplio de blancos o con una mayor toxicidad (comparadas con las toxinas de las cuales fueron derivadas). — La toxina Cry1Ab no es toxica contra <i>Spodoptera exigua</i> pero la toxina híbrida que contiene el dominio III de Cry1C mostró una toxicidad 10 veces más alta que la de la toxina parental Cry1C (deMaagd <i>et al.</i>, 1996).
	Remoción de pequeñas regiones de la toxina	<ul style="list-style-type: none"> — La eliminación de una región del N-terminal (que incluía la hélice $\alpha 1$) de Cry1Ac y Cry1Ab resultó en toxinas que forman oligómero sin requerir el contacto con el receptor caderina y que matan insectos resistentes a toxinas Cry1A (Soberón <i>et al.</i>, 2007).

Tabla 1. Estrategias para mejorar la actividad insecticida de las toxinas Cry. Se muestran dos estrategias generales y algunos ejemplos de aplicación de cada una de ellas, así como una breve descripción de los mismos (basado en Pardo-López *et al.*, 2008).

Antecedentes

Procesamiento del extremo N-terminal

Es claro que el procesamiento proteolítico del extremo N-terminal es un paso esencial temprano en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1. En 2002 Bravo *et al.* demostraron que una toxina mutante de Cry1Ac a la cual se le removió el sitio de corte por tripsina, en el N-terminal (R28T y I29M), fue incapaz de formar poros en vesículas de membranas de células de borde en cepillo de *M. sexta in vitro*, además la toxicidad de dicha mutante se redujo 25 veces *in vivo*.

En un trabajo del laboratorio, realizado por Miranda *et al.* en 2001, se comparó la acción de las proteasas del jugo de intestino medio de *M. sexta* con la acción de tripsina en el procesamiento de la toxina Cry1Ab. Se observó que al utilizar el jugo de intestino medio de larvas del insecto se producían mayoritariamente dos tipos de cortes (en el extremo N-terminal, en el dominio I): uno que abarcaba la hélice $\alpha 1$ y la mitad de $\alpha 2a$ y otro que abarcaba $\alpha 1$ y $\alpha 2a$ completa, generándose proteínas de 60 y 58 kDa, respectivamente. La primera fue la que mostró la mayor actividad formadora de poro (el tratamiento con tripsina no generó estos cortes en Cry1Ab). Los ensayos de formación de poro mostraron que el tratamiento con el jugo intestinal produjo una toxina más activa que el tratamiento con tripsina, efecto atribuible a los cortes mencionados.

En un trabajo similar, se evaluó el papel de la proteólisis sobre la potencia de Cry1Ac (Lightwood *et al.*, 2000). Se utilizó el jugo gástrico de larvas de dos especies de insectos, una susceptible a Cry1Ac (*Pieris brassicae*) y otra que no lo es (*Mamestra brassicae*), y mediante secuenciación del N-terminal se determinó el procesamiento proteolítico de la toxina cuando era tratada con los diferentes jugos gástricos de esos insectos (tabla 2).

Insecto (jugo gástrico)	Secuencia del N-terminal*	Posición del sitio de corte en Cry1Ac**	Masa molecular (kDa)
<i>M. brassicae</i>	²⁹ IETGY	Antes de $\alpha 1$	60
<i>M. brassicae</i>	³⁴ TPIDI	Antes de $\alpha 1$	60
<i>M. brassicae</i>	⁵¹ VPGAG	Entre $\alpha 1$ y $\alpha 2a$	58
<i>M. brassicae</i>	⁵⁷ VLGLV	En $\alpha 2a$	40
<i>M. brassicae</i>	⁶⁷ IFGPS	Entre $\alpha 2a$ y $\alpha 2b$	40
<i>M. brassicae</i>	⁶⁹ GPSQW	Entre $\alpha 2a$ y $\alpha 2b$	40
<i>P. brassicae</i>	²⁹ IETGY	Antes de $\alpha 1$	60
<i>P. brassicae</i>	⁵⁴ AGFVL	En $\alpha 2a$	56
<i>P. brassicae</i>	⁶¹ VDIIW	En $\alpha 2a$	56
<i>P. brassicae</i>	⁶⁹ GPSQW	Entre $\alpha 2a$ y $\alpha 2b$	56

Tabla 2. Análisis del procesamiento proteolítico de Cry1Ac con el jugo gástrico de larvas de dos especies de insectos, una susceptible (*Pieris brassicae*) y otra que no lo es (*Mamestra brassicae*). Mediante secuenciación del N-terminal se determinó un procesamiento proteolítico diferente en ambos insectos. *El número del superíndice indica el aminoácido en el N-terminal en la secuencia de Cry1Ac. ** Predicción de la estructura secundaria basada en la estructura tridimensional de Cry1Aa (adaptado de Lightwood *et al.*, 2000).

En el artículo se menciona que Cry1Ac fue 2000 veces más activa contra *P. brassicae* que contra *M. brassicae* y que ello podría estar relacionado con el procesamiento proteolítico diferente en esos insectos, sin embargo, no se realizaron bioensayos con las proteínas procesadas proteolíticamente para evaluar si eso tenía algún efecto en la toxicidad de Cry1Ac. Consideramos que algunos sitios de corte mostrados en la tabla pueden ser importantes en el procesamiento de la toxina Cry1Ac en el intestino de las larvas para llevar a cabo su efecto insecticida.

En otras toxinas bacterianas formadoras de poro (aerolisina, toxina del antrax), el contacto con el receptor permite un pequeño cambio conformacional que induce un corte proteolítico extra. Este corte es necesario para disparar un cambio que conlleva a la oligomerización de esas toxinas. Aparentemente las toxinas Cry1A de *B. thuringiensis* también requieren unirse al receptor, en este caso una proteína tipo caderina, para inducir el corte proteolítico que permita la oligomerización, la formación del poro, y su inserción en la membrana.

En otro trabajo de nuestro grupo en 2002, utilizando también la toxina Cry1Ab, se observó que la incubación de esta toxina con un anticuerpo de una sola cadena, denominado scFv73 que mimetiza el receptor tipo caderina, y el tratamiento con jugo de intestino medio de *M. sexta* o tripsina, resultaron en preparaciones de toxina que mostraron una alta actividad formadora de poro *in vitro*. Esta actividad correlacionó con la formación de un oligómero de 250 kDa que, en base a la secuenciación del N-terminal de dicho oligómero, carecía de la hélice $\alpha 1$ en el dominio I (Gómez, 2002b). Sin embargo, la secuencia obtenida del N-terminal no mostró un resultado único por lo que no dejó en claro si sólo el corte de $\alpha 1$ es fundamental para la actividad formadora de poro de la toxina, o si cortes en otros residuos también conducen a la formación de estructuras oligoméricas activas.

Como un dato interesante, tenemos que en 2005 Boonserm y colaboradores, reportaron la estructura cristalográfica de la toxina Cry4Ba, que es específicamente tóxica para larvas de mosquitos *Aedes aegypti* y *Anopheles spp.*, en la cual, la ausencia de las hélices $\alpha 1$, $\alpha 2a$ y parte de $\alpha 2b$ (debida a proteólisis durante la cristalización) no alteró la toxicidad y promovió que el resto de la hélice $\alpha 2b$ se estructurara formando parte de la hélice $\alpha 3$. La cristalización de esta toxina truncada resultó en la formación de un trímero (Boonserm *et al.*, 2005). Lo anterior permite suponer que las primeras hélices no son esenciales para la actividad larvicida, pero por otro lado, sí pueden estar influenciando un re-arreglo conformacional que favorezca la oligomerización.

En la tabla 3 se muestra una comparación entre los trabajos antes mencionados con respecto a lo que se ha reportado sobre el procesamiento proteolítico del extremo N-terminal de las toxinas Cry1Ab y Cry4Ba. En los dos trabajos con Cry1Ab se utilizó jugo de intestino medio de *M. sexta* y se secuenció el extremo N-terminal de los productos del tratamiento proteolítico.

Las secuencias reportadas corresponden a lo que se obtuvo mayoritariamente, es decir, no se estableció concretamente cual sería el procesamiento proteolítico óptimo para la toxina. Otro hecho desfavorable está en que antes del 2002, el concepto del oligómero como elemento fundamental del mecanismo de acción de las toxinas Cry no había sido propuesto y por lo tanto no se hicieron estudios al respecto. Cabe mencionar que hasta ahora, la obtención de oligómero en el laboratorio es un evento poco eficiente; pensamos que esto es debido a que no hemos encontrado las condiciones óptimas que lo favorezcan (incluido el corte en el amino terminal), por lo tanto, los estudios que permitan mejorar el rendimiento en la oligomerización son de especial interés para el grupo.

Toxina	Corte proteolítico	Toxicidad	Secuencia de aminoácidos del N-terminal	Proteasas utilizadas	Referencia
Cry1Ab	$\alpha 1$ y parte de $\alpha 2a$	Si	⁵⁷ LGLVDI (Cry1Ac Mod)	Jugo de intestino medio de <i>M. sexta</i> y <i>S. frugiperda</i>	Miranda, et al. 2001
Cry1Ab	$\alpha 1$ y $\alpha 2a$	Disminuida	⁶⁷ FGPSQW	Jugo de intestino medio de <i>M. sexta</i> y <i>S. frugiperda</i>	Miranda, et al. 2001
Cry1Ab	$\alpha 1$	Si	²⁹ IETGYTP ⁵¹ VPGAG (oligómero)	Jugo de intestino medio de <i>M. sexta</i>	Gómez, et al. 2002
Cry4Ba	$\alpha 1$, $\alpha 2a$ y parte de $\alpha 2b$	Si		Quimotripsina	Boonserm, et al. 2005

Tabla 3. Comparación entre diversos cortes proteolíticos de hélices α (cerca al N-terminal en el dominio I de toxinas Cry) y su efecto en la toxicidad.

Modificaciones en el extremo N-terminal de toxinas Cry: una posible estrategia para mejorar la actividad insecticida

Actualmente, se plantea el hecho de que las supresiones de pequeños segmentos de proteínas Cry en el N-terminal podrían resultar en toxinas activas útiles para contrarrestar la resistencia de plagas de insectos hacia las toxinas Cry1A silvestres. Nosotros proponemos que además del corte de aminoácidos en el extremo N-terminal, se requiere eliminar algunas de las hélices alfa (como la hélice $\alpha 1$ y posiblemente la hélice $\alpha 2a$) para inducir la oligomerización y la formación del poro. Esto es debido a que la supresión de una región en el N-terminal, que abarcaba a la hélice $\alpha 1$ y parte de la hélice $\alpha 2a$, en proteínas Cry1A resultó en toxinas (denominadas Cry1A Mod) que forman oligómero sin necesidad de interactuar con el primer receptor tipo caderina y que matan insectos resistentes, a toxinas Cry1A, que carecen de dicho receptor (Soberón *et al.*, 2007).

La estructura tridimensional de la protoxina de Cry2Aa se ha resuelto, en contraste, para otras toxinas Cry se ha determinado la estructura cristalográfica de la toxina activada. La estructura de la protoxina de Cry2Aa incluye 49 residuos presentes en la región amino terminal que se eliminan durante la activación con tripsina. La remoción de dicho fragmento mediante proteólisis permite la exposición de regiones de la toxina entre las que destaca la región de reconocimiento al receptor (Morse *et al.*, 2001), es decir, los primeros 49 residuos antes de la hélice $\alpha 1$ están bloqueando el sitio de unión al receptor. Las proteasas del intestino de las larvas cortan esa región y permiten que la toxina se pueda unir a su receptor.

En un trabajo publicado por Mandal y colaboradores en 2007, se menciona la supresión de un segmento de 42 residuos de la región del N-terminal de la toxina Cry2Aa que resultó en un incremento de tres veces en la toxicidad de esta proteína contra *Spodoptera littoralis* y contra *Agrotis ipsilon*. Si además de la remoción se incluían también dos mutaciones puntuales (K63F y K64P) la toxicidad se incrementaba hasta seis veces. Es importante destacar que dichas supresiones no incluían a la hélice $\alpha 1$ del dominio I.

El presente proyecto plantea conocer los efectos de la eliminación de diversos segmentos en la región del N-terminal, que incluyan las primeras tres hélices α en el dominio I de Cry1Ac, en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1A. A excepción de los trabajos del grupo, a la fecha no hay otros reportes sobre toxinas Cry con eliminaciones de este tipo que permitan dilucidar su efecto sobre la expresión, estabilidad del plegamiento y actividad biológica de dichas proteínas modificadas *ab initio*.

Con base a todo lo mencionado, en nuestro grupo tenemos un claro interés en entender qué componentes estructurales de las proteínas Cry1A son dispensables para la obtención de toxinas que conserven (e inclusive incrementen) su actividad insecticida y que resulten efectivas para superar la resistencia en insectos.

Hipótesis

Dado que las toxinas Cry1AMod son capaces de formar oligómero y de ser tóxicas contra insectos lepidópteros, tanto susceptibles como resistentes, consideramos importante determinar la toxina Cry1Ac mínima suficiente que conserve su toxicidad y su capacidad de oligomerización.

Objetivo general

Determinar los segmentos de la proteína Cry1Ac, hacia el extremo N-terminal, que son dispensables en la formación del oligómero y en la toxicidad contra insectos lepidópteros.

Objetivos particulares

1. Diseño y construcción de diversas mutantes de la toxina Cry1Ac con remociones en el extremo N-terminal mediante ligación de fragmentos de ADN, con sitios de restricción específicos, obtenidos mediante PCR.
2. Caracterización bioquímica y determinación de la toxicidad de las proteínas mutantes obtenidas mediante ensayos de toxicidad contra *Manduca sexta*.

En el siguiente esquema se muestran las siete construcciones diseñadas. Cada flecha muestra el sitio en donde comenzaría cada una (inmediatamente después de la metionina de inicio) con respecto a la secuencia de la proteína Cry1Ac silvestre reportada. Se indica también el sitio de inicio de la Cry1AcMod, reportada por Soberón *et al.* en 2007, para efecto de comparación con las construcciones obtenidas durante el presente trabajo.

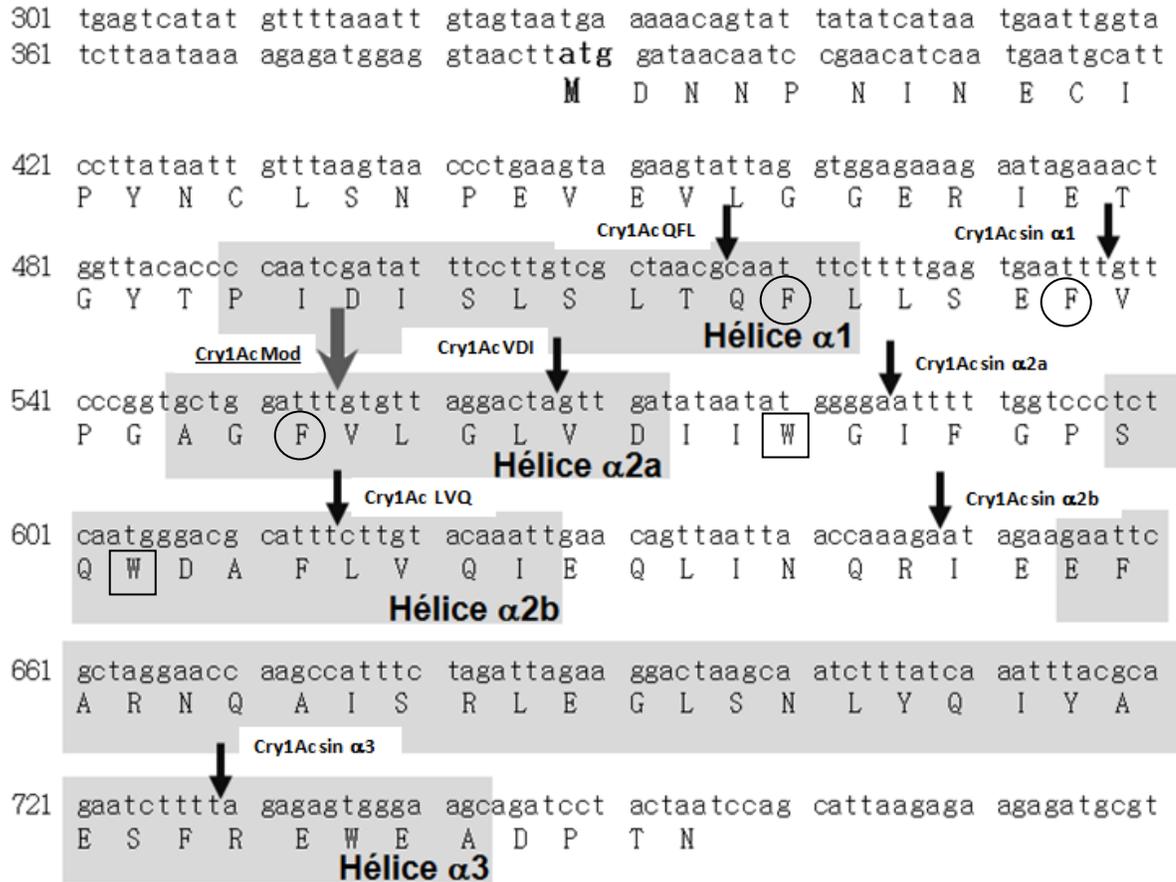


Figura 6. Construcciones planteadas de Cry1Ac. Se muestra la secuencia nucleotídica (y aminoácidos asociados) de una parte del dominio I de Cry1Ac donde se resaltan las regiones correspondientes a las primeras tres hélices alfa. Las flechas indican el sitio de inicio de las toxinas, según el caso. La flecha más grande (en gris) indica el sitio donde inicia la toxina Cry1AcMod. En círculos se encerraron las tres fenilalaninas que podrían estar interactuando entre sí y en cuadrados se encerraron los dos triptófanos que podrían estar interactuando entre sí.

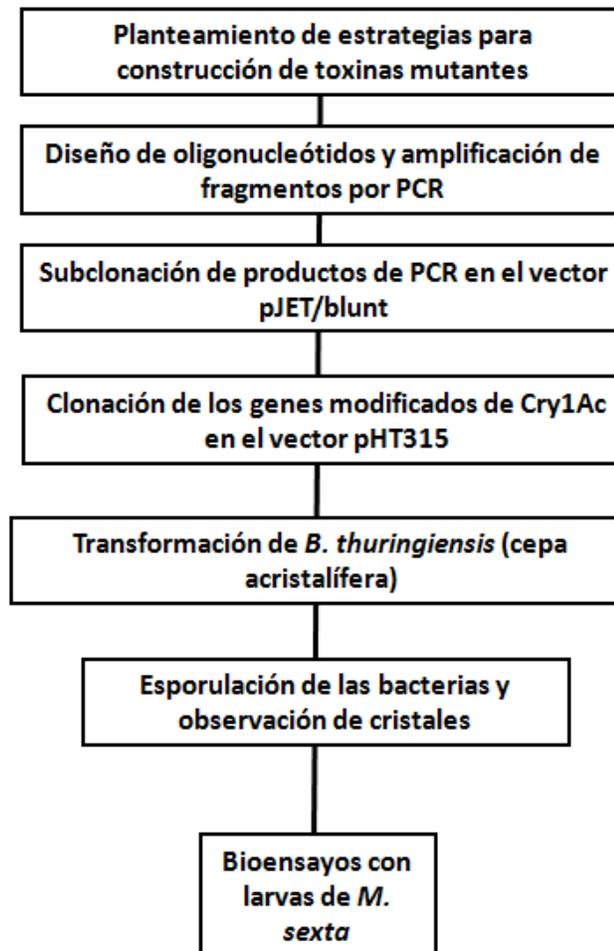
En el esquema se puede apreciar que cuatro de las construcciones implican la eliminación de regiones que corresponden a hélices α , pues queríamos determinar su influencia en la oligomerización y la toxicidad de Cry1Ac. Las otras tres construcciones (QFL, VDI y LVQ) tienen que ver con la idea de determinar la posible importancia de ciertos aminoácidos aromáticos (Phe45, Phe50, Phe56, Trp65 y Trp73) cercanos a los sitios donde inician cada una de ellas, ya que al analizar, por simple inspección, el modelo tridimensional de Cry1Aa (mediante el programa computacional *Swiss-PdbViewer* y utilizando el archivo 1CIY del PDB) se observó que

las tres fenilalaninas se encontraban a una distancia de entre 3 y 4 Å entre sí y, por otro lado, los dos triptófanos se encontraban a una distancia aproximada de 3 Å entre sí; haciéndonos pensar que tendrían una interacción importante para la conformación de la proteína. Dicho de otra manera, encontramos un trío de fenilalaninas en posible interacción y un par de triptófanos también en posible interacción.

En la mutante QFL, la región con todos los aminoácidos aromáticos mencionados se mantuvo. En la mutante VDI la región con dichas fenilalaninas fue eliminada, pero se mantuvieron los triptófanos. Adicionalmente la mutante VDI era de especial interés dado que su sitio de inicio era el más cercano al de la Cry1AcMod. Finalmente, la mutante LVQ carece de la región con todos los aminoácidos destacados anteriormente.

Estrategia experimental

A continuación, se muestran el diagrama de trabajo y, en la página siguiente, un esquema general de las construcciones realizadas:



Materiales y métodos

Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos para las dos estrategias a utilizar mediante los programas computacionales oligo 4 y oligo 6. En algunos se incluyeron sitios de restricción que generaran extremos cohesivos para las ligaciones posteriores. Los oligonucleótidos se sintetizaron en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM mediante el método del fosfito-triéster en fase sólida.

Oligonucleótidos para la estrategia uno:

Oligo	Tamaño en pares de bases	Secuencia (5'-3') y sitio de restricción (subrayado)
P1GR (upper)	28 pb	CCCAAGCTTGCAGGTAATGGTTCTAAC <i>Hind</i> III
P2GR (lower)	24 pb	GATTGTTATCCATGGGTTACCTCC <i>Nco</i> I
P7ALE (upper)	29 pb	CAGTTACTGCAAGGATCCAGGCTGAATAT <i>Bam</i> HI
P4ALE (lower)	25 pb	AGTAACCCCGGGGCTCCATCTACAA <i>Cfr</i> 9I (<i>Xma</i> I)
QFL-3f (upper)	25pb	TGGATCCATGGCACAATTTCTTTTG <i>Nco</i> I
VDI-3f (upper)	28pb	TGGATCCATGGCAGTTGATATAAATATGG <i>Nco</i> I
LVQ-3f (upper)	25pb	TGGATCCATGGCACTTGTACAAATT <i>Nco</i> I
P6ALE (lower)	29pb	ATATTCAGCCTGGATCCTTGCAGTAACTG <i>Bam</i> HI

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en la estrategia 1.

Oligonucleótidos para la estrategia dos:

Oligo	Tamaño	Secuencia (5'-3') y sitio de restricción (subrayado)
P1GRmod (upper)	27pb	TATA <u>AAGCTT</u> GCAGGTAAATGGTTCTAA <i>Hind III</i>
RG3 (lower)	26pb	CATAAGTTACTTCCATCTCTTTTATT
RG4 (upper)	44pb	AATAAAAGAGATGGAGGTAACCTTATGGTTCCCGGTGCTGGATT
RG5 (upper)	47pb	AATAAAAGAGATGGAGGTAACCTTATGATTTTTGGTCCCTCTCAATGG
LP23 (upper)	44pb	AATAAAAGAGATGGAGGTAACCTTATGATAGAAGAATTCGCTAGG
LP24 (upper)	44pb	AATAAAAGAGATGGAGGTAACCTTATGAGAGAGTGGGAAGCAGAT
P6ALEmod (lower)	27pb	ATATTCAGCCTGGATCCTTGCAGTAAC <i>Bam HI</i>
P7ALE (upper)	29 pb	CAGTTACTGCAAGGATCCAGGCTGAATAT <i>Bam HI</i>
P4ALE (lower)	25 pb	AGTAACCCCGGGGCTCCATCTACAA <i>Cfr 9I (Xma I)</i>

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en la estrategia 2.

Purificación de oligonucleótidos mediante PAGE

Los oligonucleótidos de 40 pb (o más) fueron purificados mediante este procedimiento.

Se prepararon, y filtraron, 100 mL de solución stock de acrilamida al 15% y 7M de Urea. Se elaboró un gel de acrilamida mezclando 15mL de la solución stock, 120 µL de persulfato de amonio (APS) al 10% y 15 µL de TEMED en una cámara de electroforesis tipo "*Tall mighty*" con separadores de 1.5 mm y peine de 5 pozos del mismo grosor.

Se pre-corrió el gel durante 15 minutos a 350V. Se apagó la fuente de poder y se lavaron los pozos con el buffer de corrida (TBE 1X) utilizando una jeringa de 5mL. Se cargaron 50 µg de oligo crudo por carril y un volumen de azul de bromofenol equivalente a la quinta parte del volumen del oligo. Se corrió el gel a 350V hasta que el colorante empezó a salir por el borde inferior del gel (aprox. 1.5h). Se observó el gel sobre una placa de silica fluorescente con luz UV de onda corta (254nm) y se cortó la

banda correspondiente a la longitud del oligo (la banda de mayor concentración y de menor migración).

Se colocó la banda en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se agregó 1mL de Agua mQ estéril hasta cubrir totalmente el trozo de gel. Se incubó a 37 grados durante 12 horas con agitación rotatoria. Se desechó el sobrenadante y se concentró la solución hasta 200 μ L en un equipo Savant con calentamiento ligero (no mayor de 40 grados) por un lapso de 2 horas aproximadamente. Se agregó 1 mL de nButanol y se agitó fuertemente durante 30 segundos. Se centrifugó a 13000 rpm durante 1min. Se eliminó la fase superior y se repitió una vez más la extracción con nButanol. En este punto solo quedó un pellet transparente.

Se adicionó 1 mL de etanol absoluto y se agitó en un *vortex*, luego se centrifugó 3 minutos. Se eliminó el sobrenadante por decantación y el sedimento fue secado en un equipo Savant. Se disolvió el sedimento en 115 μ L de Agua mQ estéril y se midió la absorbancia a 260nm. La dilución para medir absorbancia fue de 5 μ L de oligo y 495 μ L de agua. El valor leído era multiplicado por 3.3 y se obtenía la concentración en μ g/ μ L.

Ensayos de PCR

a) Estrategia uno.

Esta estrategia implicaba la ligación de tres fragmentos de ADN (que conformarían el gen de la toxina Cry1Ac mutante) con el vector pHT315, específico para *B. thuringiensis*. Los fragmentos consistían de aquel de la región promotora de la transcripción, el de la toxina (según cada construcción) y el del C-terminal que incluye la región del terminador. Cada fragmento tenía sitios de restricción en sus extremos para poder llevar a cabo la ligación con el vector mencionado.

El fragmento de la región promotora de la transcripción y el del C-terminal, que incluye la región del terminador, fueron amplificados mediante las siguientes condiciones de PCR:

Fragmento con promotores		Fragmento C-terminal	
Reactivo	μ L	Reactivo	μ L
Buffer ThermoPol 10X	5.0	Buffer ThermoPol 10X	5.0
dNTPs 2.5mM	3.0	dNTPs 2.5mM	3.0
Oligo P1GR 10 pmol/uL	2.0	Oligo P7ALE 10 pmol/ μ L	2.0
Oligo P2GR 10 pmol/ μ L	2.0	Oligo P4ALE 10 pmol/ μ L	2.0
Templado de ADN 100 ng/ μ L	1.0	Templado de ADN 100 ng/ μ L	1.0
Enzima Vent polimerasa	0.5	Enzima Vent polimerasa	0.5
Agua destilada	36.5	Agua destilada	36.5

Volumen final 50 μ L

El templado de ADN utilizado fue el plásmido pHT3101 que contiene la secuencia nucleotídica del gen de Cry1Ac.

La amplificación se realizó con el siguiente programa:

95°C 3 minutos un ciclo
95°C 1 minuto }
55°C 1 minuto } 30 ciclos
72°C 2 minutos }
72°C 7 minutos un ciclo

El tamaño de los fragmentos obtenidos fue de 380 pb para el fragmento con los promotores y de 2069 pb para el fragmento del C-terminal.

A continuación, se presenta un esquema para explicar la amplificación de estos fragmentos:

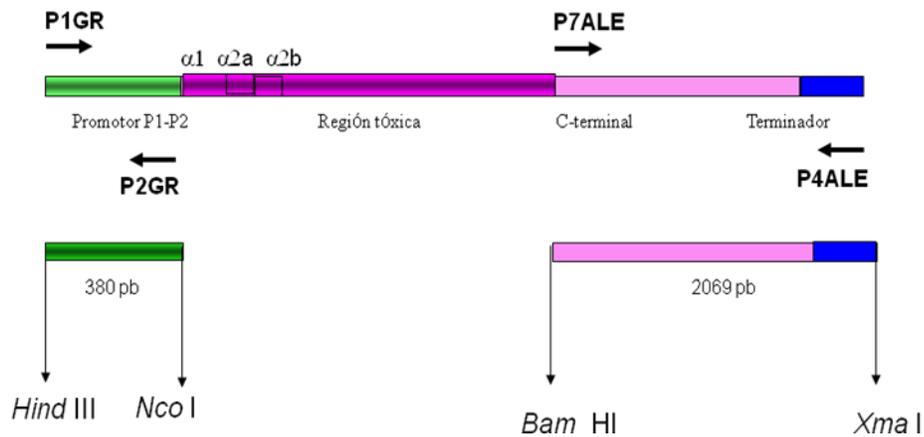


Figura 7. Esquematización de la amplificación del fragmento con la región promotora usando los oligonucleótidos P1GR (*upper*) y P2GR (*lower*) y de la amplificación del fragmento del C-terminal, que incluye la región del terminador, utilizando los oligonucleótidos P7ALE (*upper*) y P4ALE (*lower*). Se muestran los sitios de restricción que se incluyeron.

Los fragmentos de la región tóxica de Cry1Ac necesarios para obtener las mutantes QFL, VDI y LVQ fueron amplificados mediante las siguientes condiciones de PCR:

Fragmento QFL		Fragmento VDI	
Reactivo	μL	Reactivo	μL
Buffer ThermoPol 10X	5.0	Buffer ThermoPol 10X	5.0
dNTPs 2.5mM	3.0	dNTPs 2.5mM	3.0
Oligo QFL-3f 10 pmol/μL	2.0	Oligo VDI-3f 10 pmol/μL	2.0
Oligo P6ALE 10 pmol/μL	2.0	Oligo P6ALE 10 pmol/μL	2.0
Templado de ADN 100 ng/μL	1.0	Templado de ADN 100 ng/μL	1.0
Enzima Vent polimerasa	0.5	Enzima Vent polimerasa	0.5
Agua destilada	36.5	Agua destilada	36.5
Fragmento LVQ			
Reactivo	μL		
Buffer ThermoPol 10X	5.0		
dNTPs 2.5 mM	3.0		
Oligo LVQ-3f 10 pmol/μL	2.0		
Oligo P6ALE 10 pmol/μL	2.0		
Templado de ADN 100 ng/μL	1.0		
Enzima Vent polimerasa	0.5		
Agua destilada	36.5		

Volumen final 50μL

El oligonucleótido *upper* utilizado era diferente en cada caso y dependía de la onstrucción por generar. El oligonucleótido *lower* fue el mismo para todos los casos.

El templado de ADN utilizado fue el plásmido pHT3101 que contiene la secuencia nucleotídica del gen de Cry1Ac.

La amplificación se realizó con el siguiente programa:

95°C	3 minutos	} 30 ciclos	un ciclo
95°C	1 minuto		
55°C	1 minuto		
72°C	2 minutos		
72°C	10 minutos		un ciclo

El tamaño de los fragmentos obtenidos era distinto: para Cry1Ac QFL era de 1732 pb, para Cry1Ac VDI era de 1681 pb y para Cry1Ac LVQ era de 1633 pb.

A continuación, se presenta un esquema para explicar la amplificación de los fragmentos de toxina Cry1Ac a partir del templado. Se muestra, como ejemplo, solamente el caso de la construcción QFL:

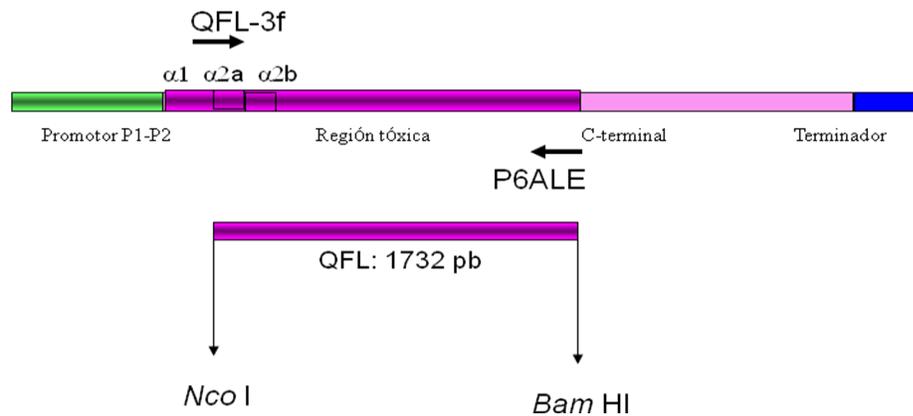


Figura 8. Esquematación de la amplificación del fragmento tóxico para la proteína Cry1Ac QFL usando los oligonucleótidos QFL-3f (*upper*) y P6ALE (*lower*). Se muestran los sitios de restricción que se incluyeron.

b) Estrategia dos.

Esta estrategia implicaba la ligación de sólo dos fragmentos de ADN (que conformarían el gen de la toxina Cry1Ac mutante) con el vector pHT315, específico para *B. thuringiensis*. Los fragmentos consistían de aquel de la región promotora de la transcripción unido al de la toxina (según cada construcción) y el del C-terminal que incluye la región del terminador. Para lograr esto, se amplificaba el fragmento que tenía la región promotora de la transcripción y, por otro lado, aquel que tenía la región de la toxina (según cada construcción). Una vez purificados ambos fragmentos eran acoplados en uno solo mediante una reacción de PCR que denominamos: “de ensamble”. De manera similar a la estrategia anterior, los fragmentos tenían en sus extremos sitios de restricción para la posterior ligación con el vector mencionado.

Para amplificar el fragmento con las secuencias promotoras (denominado *megaprimer*) se utilizaron las siguientes condiciones de PCR:

Reactivo	µL
Buffer ThermoPol 10X	5.0
dNTPs 2.5mM	3.0
Oligo P1GRmod 10 pmol/µL	2.0
Oligo RG3 10 pmol/µL	2.0
Templado de ADN 100 ng/µL	1.0
Enzima Vent polimerasa	0.5
Agua destilada	36.5

Volumen final 50µL

El templado de ADN utilizado fue el plásmido que contiene la secuencia nucleotídica de Cry1Ac Mod.

La amplificación se realizó con el siguiente programa:

95°C 3 minutos un ciclo
 95°C 1 minuto }
 48°C 1 minuto } 30 ciclos
 72°C 1 minutos }
 72°C 10 minutos un ciclo

El tamaño esperado del fragmento era de 380 pb.

En seguida, se presenta un esquema para explicar la amplificación de dicho fragmento:

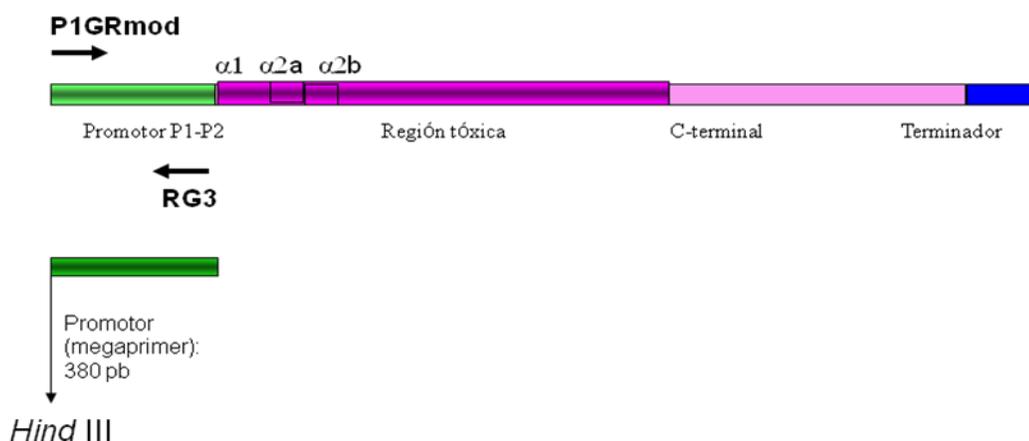


Figura 9. Esquematación de la amplificación del fragmento con el promotor (*megaprimer*) usando los oligonucleótidos P1GRmod (*upper*) y RG3 (*lower*). Se muestra el sitio de restricción que se incluyó.

Los fragmentos de ADN de la región de la toxina (sin hélice $\alpha 1$, sin hélice $\alpha 2a$, sin hélice $\alpha 2b$ y sin hélice $\alpha 3$) se amplificaron bajo las siguientes condiciones:

Fragmento sin $\alpha 1$		Fragmento sin $\alpha 2a$	
Reactivo	μL	Reactivo	μL
Buffer ThermoPol 10X	5.0	Buffer ThermoPol 10X	5.0
dNTPs 2.5 mM	3.0	dNTPs 2.5 mM	3.0
Oligo RG4 10 pmol/ μL	1.3	Oligo RG5 10 pmol/ μL	3.4
Oligo P6ALEmod 10 pmol/ μL	2.0	Oligo P6ALEmod 10 pmol/ μL	2.0
Templado de ADN 100 ng/ μL	1.0	Templado de ADN 100 ng/ μL	1.0
Enzima Vent polimerasa	0.5	Enzima Vent polimerasa	0.5
Agua destilada	37.2	Agua destilada	35.1

Fragmento sin $\alpha 2b$		Fragmento sin $\alpha 3$	
Reactivo	μL	Reactivo	μL
Buffer ThermoPol 10X	5.0	Buffer ThermoPol 10X	5.0
dNTPs 2.5 mM	3.0	dNTPs 2.5 mM	3.0
Oligo LP23 10 pmol/ μL	1.7	Oligo LP24 10 pmol/ μL	1.3
Oligo P6ALEmod 10 pmol/ μL	2.0	Oligo P6ALEmod 10 pmol/ μL	2.0
Templado de ADN 100 ng/ μL	1.0	Templado de ADN 100 ng/ μL	1.0
Enzima Vent polimerasa	0.5	Enzima Vent polimerasa	0.5
Agua destilada	36.8	Agua destilada	37.2

Volumen final 50 μL

El templado de ADN utilizado fue el plásmido pHT3101 que contiene la secuencia nucleotídica del gen de Cry1Ac.

La amplificación se realizó con los siguientes programas:

- Para los fragmentos sin hélice $\alpha 1$ y sin hélice $\alpha 2a$ (1698 pb y 1650 pb, respectivamente):

95°C 3 minutos un ciclo
 95°C 1 minuto }
53°C 1 minuto } 30 ciclos
 72°C 2 minutos }
 72°C 10 minutos un ciclo

- Para los fragmentos sin hélice $\alpha 2b$ y sin hélice $\alpha 3$ (1614 pb y 1533 pb, respectivamente):

95°C 3 minutos un ciclo
 95°C 1 minuto }
55°C 1 minuto } 30 ciclos
 72°C 2 minutos }
 72°C 10 minutos un ciclo

En seguida, se presentan dos esquemas para explicar la amplificación de los fragmentos de toxina Cry1Ac a partir del templado. Se muestran, como ejemplos, solamente los casos de las construcciones sin hélice $\alpha 1$ y sin hélice $\alpha 2a$:

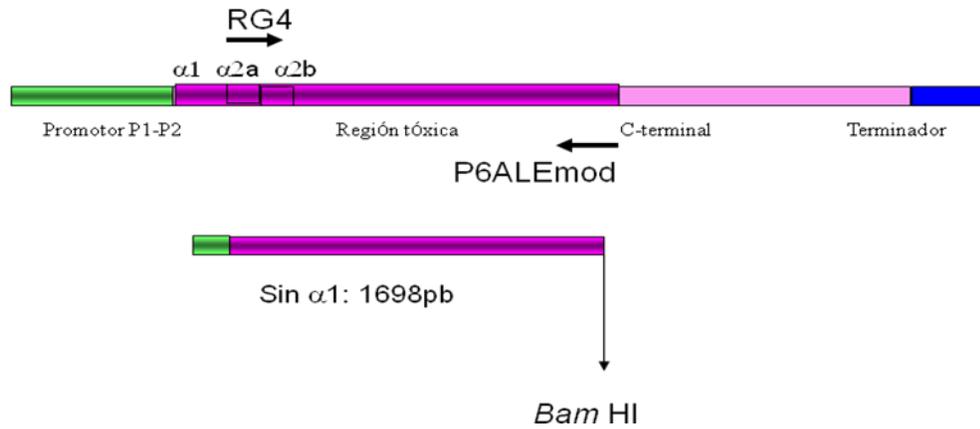


Figura 10. Esquematización de la amplificación del fragmento tóxico para la proteína sin $\alpha 1$ usando los oligonucleótidos RG4 (*upper*) y P6ALEmod (*lower*). Se señala una pequeña región que hibridaría con su complemento en el *megaprimer*, permitiendo la obtención de un solo fragmento mediante el PCR de ensamble. Se muestran el sitio de restricción que se incluyó.

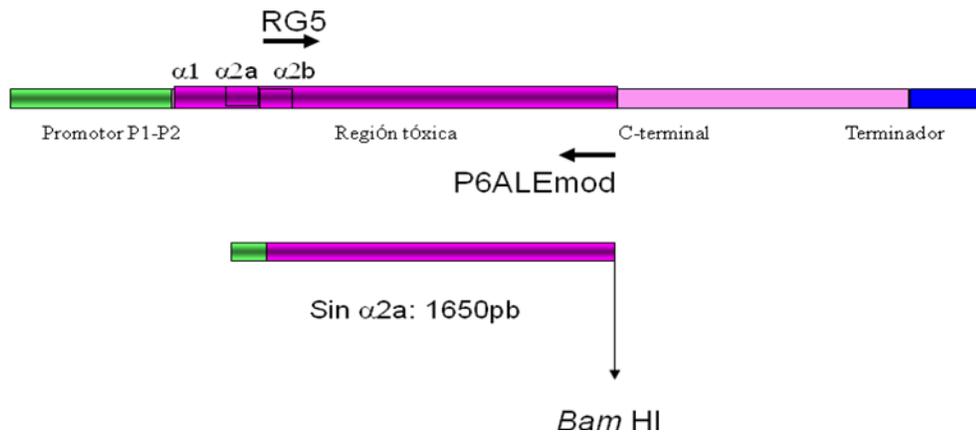


Figura 11. Esquematización de la amplificación del fragmento tóxico para la proteína sin $\alpha 2a$ usando los oligonucleótidos RG5 (*upper*) y P6ALEmod (*lower*). Se señala una pequeña región que hibridaría con su complemento en el *megaprimer*, permitiendo la obtención de un solo fragmento mediante el PCR de ensamble. Se muestran el sitio de restricción que se incluyó.

PCR de ensamble

Una vez purificados los productos de PCR del megaprimer y de la toxina (en sus diferentes variantes), se realizó un PCR para ensamblarlos en un solo fragmento. Lo anterior fue posible ya que el fragmento del promotor (*megaprimer*) tenía un extremo de empalme (3'-5') complementario con un extremo de empalme (5'-3') en cada fragmento tóxico. Dicha región de empalme era de 26 pb. En todos los casos se mantuvieron las secuencias en fase y se incluyó el codón de inicio de la traducción (ATG).

Las condiciones de reacción utilizadas fueron las siguientes:

Ensamble promotor-sin $\alpha 1$		Ensamble promotor-sin $\alpha 2a$	
Reactivo	μL	Reactivo	μL
Buffer ThermoPol 10X	5.0	Buffer ThermoPol 10X	5.0
dNTPs 2.5 mM	3.0	dNTPs 2.5 mM	3.0
Oligo P1GRmod 10 pmol/ μL	2.0	Oligo P1GRmod 10 pmol/ μL	2.0
Oligo P6ALEmod 10 pmol/ μL	2.0	Oligo P6ALEmod 10 pmol/ μL	2.0
Fragmento de 380 pb (<i>megaprimer</i>)	0.5	Fragmento de DNA 380 pb (<i>megaprimer</i>)	0.5
Fragmento de 1698 pb (sin $\alpha 1$)	0.6	Fragmento de 1650 pb (sin $\alpha 2a$)	0.6
Enzima Vent polimerasa	0.5	Enzima Vent polimerasa	0.5
Agua destilada	36.4	Agua destilada	36.4

Volumen final 50 μL

Ensamble promotor-sin $\alpha 2b$		Ensamble promotor- sin $\alpha 3$	
Reactivo	μL	Reactivo	μL
Buffer ThermoPol 10X	5.0	Buffer ThermoPol 10X	5.0
dNTPs 2.5 mM	3.0	dNTPs 2.5 mM	3.0
Oligo P1GRmod 10 pmol/ μL	2.0	Oligo P1GRmod 10 pmol/ μL	2.0
Oligo P6ALEmod 10 pmol/ μL	2.0	Oligo P6ALEmod 10 pmol/ μL	2.0
Fragmento de 380 pb (<i>megaprimer</i>)	0.5	Fragmento de DNA 380 pb (<i>megaprimer</i>)	0.5
Fragmento de 1613 pb (sin $\alpha 2b$)	0.5	Fragmento de 1532 pb (sin $\alpha 3$)	0.5
Enzima Vent polimerasa	0.5	Enzima Vent polimerasa	0.5
Agua destilada	36.5	Agua destilada	36.5

Volumen final 50 μL

Se utilizaron aproximadamente 50 ng de ADN del megaprimer con 50 ng de ADN de cada fragmento, según el caso.

El programa de amplificación utilizado se dividía en dos partes:

94°C	3 minutos	} 8 ciclos
94°C	30 segundos	
42°C	1 minuto	
72°C	1 minuto	

94°C	1 minuto	} 30 ciclos
55°C	1 minuto	
72°C	1 minuto	
72°C	7 minutos	

El tamaño esperado del fragmento ensamblado para Cry1Ac sin hélice $\alpha 1$ era de 2052 pb, para Cry1Ac sin hélice $\alpha 2a$ era de 2004 pb, para Cry1Ac sin hélice $\alpha 2b$ era de 1967 pb y para Cry1Ac sin hélice $\alpha 3$ era de 1886 pb. En seguida se muestran dos esquemas de los ensambles generados. Cada reacción de PCR para empalmar los fragmentos deseados se realizó independientemente. En los esquemas se muestran por pares:

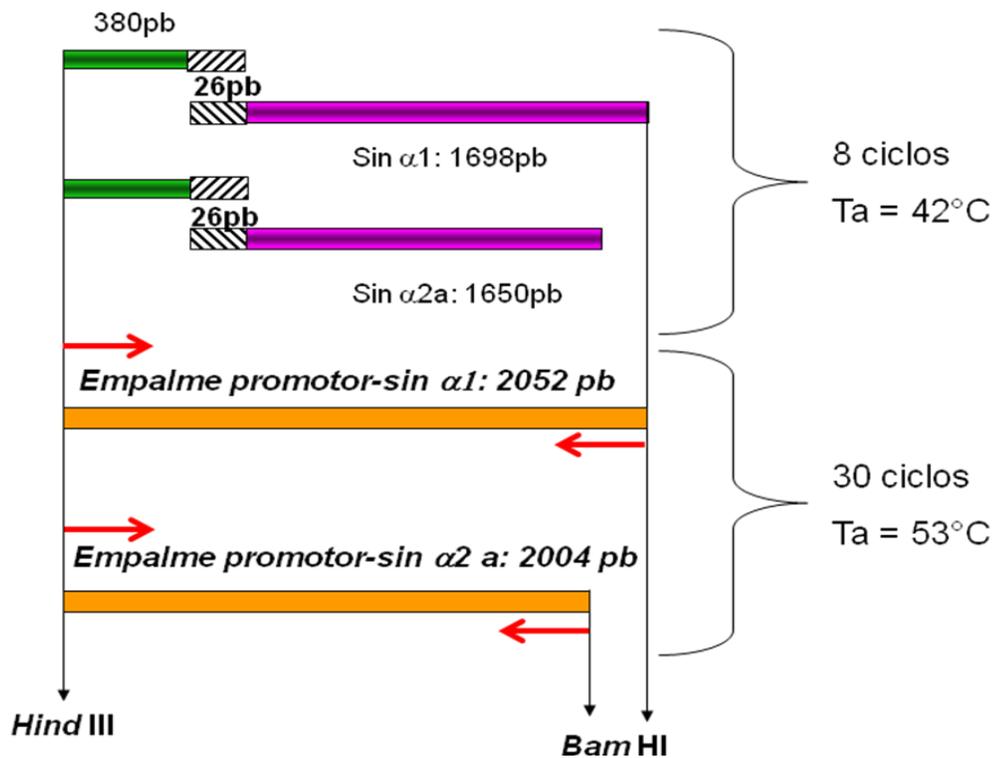


Figura 12. PCR de ensamble. El fragmento del promotor (*megaprimer*) tenía un extremo de empalme (3'-5') complementario con un extremo de empalme (5'-3') en cada fragmento tóxico de sin $\alpha 1$ y sin $\alpha 2a$ (mostrado en rayas blancas y negras). Las dos etapas del programa de amplificación se muestran con llaves; nótese que la primera etapa se realizó a la temperatura de alineamiento que favorecía la hibridación de los 26 pares de bases complementarios en ambos fragmentos, mientras que la segunda etapa se realizó a la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos de los extremos (flechas rojas). Se muestran los sitios de restricción incluidos.

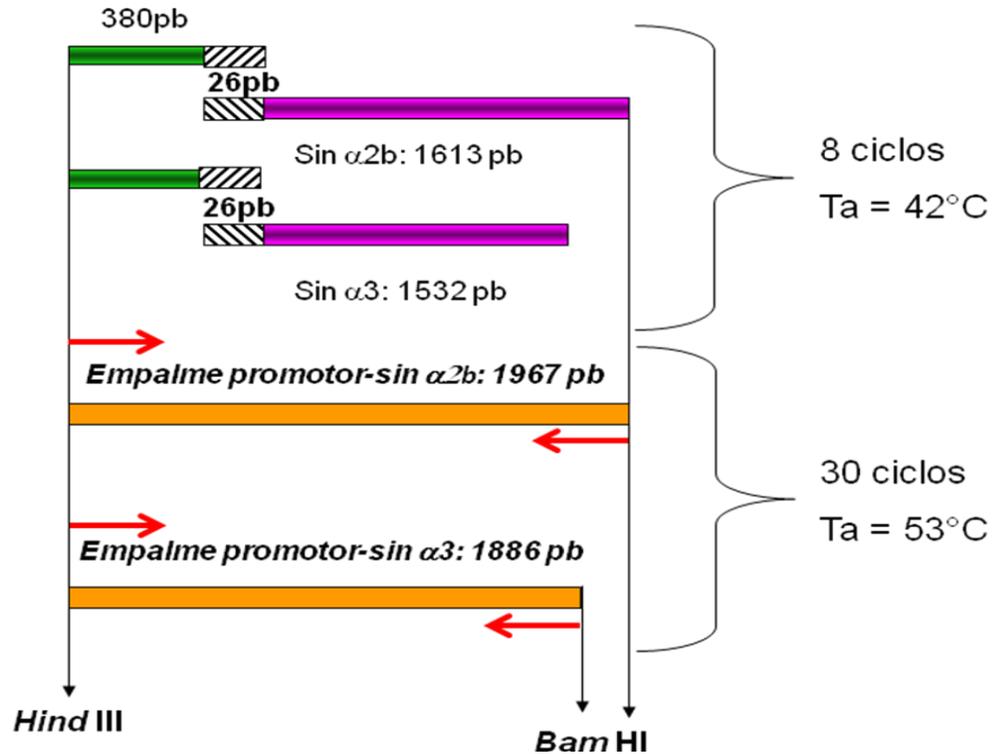


Figura 13. PCR de ensamble. El fragmento del promotor (*megaprimer*) tenía un extremo de empalme (3´-5´) complementario con un extremo de empalme (5´-3´) en cada fragmento tóxico de sin $\alpha 2b$ y sin $\alpha 3$ (mostrado en rayas blancas y negras). Las dos etapas del programa de amplificación se muestran con llaves; nótese que la primera etapa se realizó a la temperatura de alineamiento que favorecía la hibridación de los 26 pares de bases complementarios en ambos fragmentos, mientras que la segunda etapa se realizó a la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos de los extremos (flechas rojas). Se muestran los sitios de restricción incluidos.

Electroforesis de ADN

Se tomaron alícuotas de cada muestra de ADN para cargarlas en geles de agarosa al 1% con 0.003% de bromuro de etidio (10 mg/mL). Se utilizó una cámara *Mini sub cell* (Bio Rad) con buffer TAE 1X. La electroforesis se realizó aplicando 100 V durante un tiempo que dependía del tamaño de los fragmentos de ADN. Se utilizaron marcadores de masa molecular (M.M.M) de 100 y 1000 pb (New England Biolabs) según el caso.

Para una estimación de la concentración de ADN (en ng/ μL) se utilizó 1 μL de muestra y 1 μL de marcador (New England Biolabs) como referencia. También se utilizó, en ocasiones, un equipo espectrofotométrico *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific).

Purificación de plásmidos bacterianos

Para la purificación de plásmidos a partir de células transformadas de *E. coli*, se utilizó el *QIAprep Spin Miniprep kit* (QIAGEN). Los plásmidos eran almacenados en congelación.

Purificación de ADN a partir de gel de agarosa

Se cargó un volumen de muestra de ADN en un gel de agarosa al 1% y se sometió a electroforesis a 90 V el tiempo estimado en función del tamaño de la banda esperada. El gel fue expuesto brevemente a la luz ultravioleta (365 nm) de una lámpara de 6W (FOTODYNE) para cortar una rebanada del gel que contenía la banda del peso deseado. Para la purificación del ADN a partir del gel se utilizó el *MinElute Gel extraction kit* (QIAGEN).

Obtención de células de E.coli XL1blue electrocompetentes

Se tomó una colonia de células XL1blue partir de una placa de petri con medio LB sólido adicionado con tetraciclina (12.5µg/mL) y se puso a crecer en 15 mL de medio líquido LB con tetraciclina (12.5 µg/mL) a 37°C y 200 rpm de agitación toda la noche. Las bacterias crecidas en los 15 mL fueron utilizadas para inocular un matraz con 1 L de medio LB líquido que fue incubado a 37°C con agitación hasta que las células alcanzaran una densidad óptica de entre 0.4 y 0.6 leída a 600 nm. Se repartió equitativamente el contenido del matraz en cuatro botellas estériles y se mantuvieron en hielo 10 minutos. Se centrifugaron 10 minutos a 3500 rpm a 4°C en una centrifuga Beckman con rotor de ángulo fijo. Se desechó el sobrenadante y se hizo un lavado de las pastillas celulares con 250 mL (c/u) de agua estéril a 4 °C. Se volvió a centrifugar con las condiciones anteriores.

Se desecharon los sobrenadantes y las pastillas se lavaron con 250 mL de agua estéril a 4°C (c/u). Se repartió el contenido de las botellas en sólo dos. Se repitió la centrifugación, se desechó el sobrenadante y se hizo un lavado con 20 mL de glicerol al 10% a 4°C (cada pastilla celular).

Se repartió el volumen en tubos falcon y se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se re-suspendieron las pastillas celulares en 3 mL de glicerol al 10% a 4°C. Se hicieron alícuotas de 60 µL en tubos de 0.5 mL estériles. Se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -70°C. Para verificar la eficiencia de transformación de las células, se realizó un control utilizando plásmido super-enrollado.

Obtención de células de Bacillus thuringiensis electrocompetentes

La cepa acristalífera 407 cry⁺ de *Bacillus thuringiensis* se sembró en una placa de petri con medio LB y se incubó a 30°C toda una noche. Por la tarde del día siguiente se inoculó una colonia en un matraz Erlenmeyer con 20 mL de medio BHI con 0.5% de glicerol estéril y se incubó a 30 °C con 200 rpm de agitación, toda la noche.

Al día siguiente se tomaron 3 mL del pre-cultivo para inocular un matraz *Fernbatch* con 100 mL de medio BHI, con 0.5% de glicerol estéril, y se incubó a 30 °C con agitación de 200 rpm durante una hora. Posteriormente, el cultivo fue centrifugado a 5000 rpm, a 4 °C, durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el resto se re-suspendió en 50 mL de buffer EB estéril frío. Se volvió a centrifugar con las condiciones mencionadas y ahora se re-suspendió en 3 a 5 mL de buffer EB y se prepararon alícuotas de 500 µL en tubos eppendorf estériles. Las alícuotas de células fueron utilizadas en ese momento.

Obtención de células de E. coli competentes de calcio (dam⁻)

En un tubo falcon de 15 mL se adicionaron 5 mL de medio líquido LB y se inocularon con la cepa de *E.coli* SCS110 (*dam⁻*) y se incubaron a 37°C toda una noche. Al día siguiente se utilizaron 2 mL del crecimiento obtenido para inocular un matraz con 100 mL de medio líquido LB. Se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 0.6 leída a 600 nm en un espectrofotómetro (aproximadamente 2 horas). El matraz con el cultivo se puso en hielo durante 5 minutos y después se repartió su contenido en dos tubos falcon de 50 mL. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C y el botón celular fue re-suspendido en 10 mL de CaCl₂ 100 mM estéril frío. Los tubos se incubaron en hielo por 30 minutos y se volvieron a centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. El botón celular fue re-suspendido en 2 mL de CaCl₂ 100 mM estéril frío y se le adicionaron 180 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) como agente crio-preservador. Se prepararon alícuotas de 200 µL en tubos eppendorf estériles de 1.5 mL y se almacenaron a -70°C.

Transformación de células electrocompetentes mediante pulso eléctrico (electroporación)

Células XL1blue

Se utilizaron células XL1blue (*E. coli*) electrocompetentes para transformarlas con el ADN plasmídico de nuestro interés. Las células almacenadas a -70°C fueron descongeladas en hielo. Se adicionaron de 300 a 400 ng de plásmido purificado a cada alícuota de bacterias XL1blue electrocompetentes y se transfirieron a celdas *Gene Pulser Cuvette* de 0.1 cm (Bio Rad). Se sometieron a un pulso eléctrico de 1.6 V, 400 Ω y 25 µFD en un equipo *Gene Pulser* (Bio Rad). Las células fueron suspendidas en 900 µL de medio SOC líquido y transferidas a tubos falcon de 15 mL para ser puestas en recuperación durante 1 hora a 37°C y 200 rpm de agitación. Las bacterias

transformadas fueron sembradas en volúmenes de 50 y 100 μL , mediante dispersión con perlas estériles, en placas de medio LB sólido adicionado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se incubaron a 37°C toda la noche.

Células de *Bacillus thuringiensis* acristalíferas

Se utilizó la cepa acristalífera Bt 407 *cry* para electroporación. Se adicionaron 1 a 2 μg de ADN plasmídico, purificado a partir de células de *E. coli* SCS110 (*dam*), a cada alícuota de células de *B. thuringiensis* electrocompetentes, se dejaron en hielo 5 minutos y se transfirieron a celdas *Gene Pulser Cuvette* de 0.4 cm (Bio Rad).

Se sometieron a un pulso eléctrico de 2.5 V, 1000 Ω y 25 μFD en un equipo *Gene Pulser* (Bio Rad). Después del pulso eléctrico, se adicionaron 500 μL de medio BHI, con 0.5% de glicerol estéril, y se pusieron en recuperación a 30°C con agitación de 200 rpm durante una hora. Se sembraron placas de medio LB con eritromicina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con 10 y 50 μL de la suspensión de bacterias, dispersada con perlas estériles, y se pusieron a incubar a 30°C durante toda una noche. Se utilizaron controles con las mismas células y procedimiento pero sin la adición de plásmido.

Transformación de células competentes de calcio (dam-) mediante choque térmico

Cada alícuota almacenada a -70°C fue descongelada en hielo y se le adicionaron, en esterilidad, aproximadamente 3 a 4 μg de ADN plasmídico obtenido de células XL1Blue. Se incubaron 30 minutos en hielo y luego se sometieron 42°C por dos minutos. Se pusieron en hielo 5 minutos y después se le adicionaron 800 μL de medio líquido LB para incubarlos a 37°C con agitación durante 1 hora. Se tomó un volumen de 200 μL para sembrar una placa de LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó a 37°C toda una noche.

Clonación en el vector pJET1.2/blunt (2.9 Kb)

Debido a que trabajaríamos con ligaciones de varios fragmentos se decidió hacer un paso de subclonación en el vector pJET1.2/blunt para obtener los productos en gran cantidad y garantizar la generación de los extremos cohesivos.

La subclonación de los fragmentos ensamblados para la estrategia dos se realizó utilizando el *CloneJET PCR Cloning kit* (Fermentas). Los fragmentos de ADN fueron extraídos de un gel de agarosa al 1% y purificados previamente a la ligación. Dado que los productos de PCR amplificados con Vent polimerasa tienen, mayoritariamente, extremos romos; se llevó a cabo la ligación con el vector pJET1.2/blunt directamente. La proporción molar utilizada fue de 3:1 (inserto/vector). La ligasa fue inactivada a 65°C por 10 minutos y se transformaron células de *E. coli* electrocompetentes XL1blue con 2 μL de la ligación.

También se clonaron en este vector los fragmentos para la estrategia uno. Los productos de PCR de los fragmentos de Cry1Ac (promotor, C-terminal, QFL, VDI y LVQ) fueron purificados mediante el *MinElute PCR purification kit* de QIAGEN y su concentración fue estimada para llevar a cabo su clonación en el vector mencionado (proporción molar 3:1 de inserto/vector).

Obtención del plásmido pHT315 (6.5 Kb): vector específico para B. thuringiensis

Se inocularon 5 mL de medio líquido LB con ampicilina (100 µg/mL) con células XL1blue transformadas con el plásmido pHT315 (conservadas en glicerol a -70°C). Se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm toda la noche. Al día siguiente se purificó el plásmido con el kit de QIAGEN mencionado.

Digestión con enzimas de restricción

Se utilizaron las enzimas de restricción *Bam*HI, *Hind*III, *Nco*I y *Cfr*9I (*Xma*I) de la marca Fermentas (con sus respectivos buffers). La temperatura de incubación fue de 37 °C. Se utilizaron en combinaciones de dos (cuando era necesario) para la liberación de fragmentos de ADN cuidando que los medios de reacción favorecieran la actividad de ambas enzimas y que no se dieran cortes inespecíficos (efecto estrella).

En la siguiente tabla se mencionan las enzimas utilizadas para liberar los fragmentos clonados en el vector pJET1.2 según la estrategia por seguir:

Fragmento de ADN	Estrategia	Enzimas de restricción
Región promotora	Tres fragmentos	<i>Nco</i> I / <i>Hind</i> III
C-terminal	Tres fragmentos	<i>Cfr</i> 9I / <i>Bam</i> HI
Región de la toxina (QFL, VDI y LVQ)	Tres fragmentos	<i>Nco</i> I / <i>Bam</i> HI
Fragmentos ensamblados: Región promotora (<i>megaprimer</i>) con región de la toxina (sin α 1, sin α 2a, sin α 2b y sin α 3).	<i>Megaprimer</i>	<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III
C-terminal	<i>Megaprimer</i>	<i>Cfr</i> 9I / <i>Bam</i> HI
Vector pHT315	Ambas	<i>Cfr</i> 9I / <i>Hind</i> III

Tabla 6: enzimas de restricción utilizadas.

Ligaciones

Se utilizó la enzima ADN ligasa T4 y el buffer asociado (New England Biolabs). Las mezclas de reacción fueron aforadas con agua destilada hasta un volumen final de 50 μ L y se incubaban a 37 °C durante dos horas.

La ligasa y el resto de los elementos de reacción fueron removidos del ADN ligado mediante un *MinElute Reaction Cleanup kit* (QIAGEN) previamente a la electroporación. Se aplicaron dos controles utilizando el vector digerido:

1. Plásmido pHT315 con buffer, ligasa y agua (ligado consigo mismo).
2. Plásmido pHT315 con buffer y agua (sin ligar).

a) Estrategia uno.

- Cry1Ac QFL

Fragmento (ADN)	Tamaño (pb)	Proporción	ng
Promotores	380	5.0	16.0
Toxina QFL	1732	3.0	40.0
C-terminal	2069	3.0	48.0
Vector pHT315	6500	1.0	50.0

- Cry1Ac VDI

Fragmento (ADN)	Tamaño (pb)	Proporción	ng
Promotor	380	5.0	16.0
Toxina VDI	1681	3.0	40.0
C-terminal	2069	3.0	48.0
Vector pHT315	6500	1.0	50.0

- Cry1Ac LVQ

Fragmento (ADN)	Tamaño (pb)	Proporción	ng
Promotor	380	5.0	16.0
Toxina LVQ	1633	3.0	40.0
C-terminal	2069	3.0	48.0
Vector pHT315	6500	1.0	50.0

b) Estrategia dos.

▪ Cry1Ac sin $\alpha 1$

Fragmento (ADN)	Tamaño (pb)	Proporción	ng
Promotor -Toxina sin $\alpha 1$	2052	3.0	50
C-terminal	2069	3.0	50
Vector pHT315	6500	1.0	50

▪ Cry1Ac sin $\alpha 2a$

Fragmento (ADN)	Tamaño (pb)	Proporción	ng
Promotor-Toxina sin $\alpha 2a$	2004	3.0	50
C-terminal	2069	3.0	50
Vector pHT315	6500	1.0	50

▪ Cry1Ac sin $\alpha 2b$

Fragmento (ADN)	Tamaño (pb)	Proporción	ng
Promotor -Toxina sin $\alpha 2b$	1967	3.0	50
C-terminal	2069	3.0	50
Vector pHT315	6500	1.0	50

▪ Cry1Ac sin $\alpha 3$

Fragmento (ADN)	Tamaño (pb)	Proporción	ng
Promotor -Toxina sin $\alpha 3$	1886	3.0	50
C-terminal	2069	3.0	50
Vector pHT315	6500	1.0	50

PCR de colonia

Protocolo para células de *E. coli*

Para la selección de colonias transformadas que tuvieran el plásmido construido mediante ligación, se realizó PCR de colonia a partir de la suspensión de un pequeño inóculo bacterias en 40 μL de agua estéril. Las condiciones de reacción, para un volumen final de 20 μL , se muestran a continuación:

Reactivo	μL
Buffer Taq 10X	2.0
MgCl_2 25 mM	2.0
dNTPs 2.5 mM	1.5
Oligo P1GRmod 10 pmol/ μL	1.0
Oligo P4ALE 10 pmol/ μL	1.0
Templado de ADN (bacterias)	5.0
Enzima Taq polimerasa	0.5
Agua destilada	7.0

Los oligonucleótidos utilizados permitían la amplificación de la región completa de la protoxina; desde los promotores hasta el final del carboxilo terminal con el terminador. El fragmento esperado fue cercano a 4 Kb.

El programa utilizado en el termociclador fue el siguiente:

94°C	4 minutos	} 30 ciclos	un ciclo
94°C	1 minuto		
54°C	1 minuto		
72°C	2 minutos		
72°C	7 minutos		un ciclo

Se utilizaron 5 μL después de la amplificación de ADN para analizarlos en un gel de agarosa al 1%.

Protocolo para células de *B. thuringiensis*

Para corroborar la presencia del plásmido construido en las células de *B. thuringiensis* transformadas se realizó también PCR de colonia. Se puso a crecer un pequeño inóculo de bacterias en una placa de LB con eritromicina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó 4 a 5 horas a 30°C o hasta ver un leve crecimiento de colonias transparentes. Se tomó un inóculo de la placa y se mezclaba en 100 μL de agua estéril en un tubo eppendorf estéril. Las muestras fueron puestas a -70°C durante 30 minutos y luego fueron colocadas en un baño de agua en ebullición durante 10 minutos para, finalmente, ser puestas en hielo.

Las condiciones de reacción, para un volumen final de 20 μL , se muestran a continuación:

Reactivo	μL
Buffer Taq 10X	2.0
MgCl_2 25 mM	2.0
dNTPs 2.5 mM	1.5
Oligo P1GRmod 10 pmol/ μL	1.0
Oligo 16 10 pmol/ μL	1.0
Templado de ADN (bacterias)	5.0
Enzima Taq polimerasa	0.5
Agua destilada	7.0

Los oligonucleótidos utilizados permitían la amplificación de una región de la toxina, empezando desde la región promotora. El fragmento esperado era menor a 1000 pb y dependía de cada mutante.

El programa utilizado fue el siguiente:

95°C	4 minutos	} 30 ciclos	un ciclo
95°C	1 minuto		
52°C	1 minuto		
72°C	1 minuto		
72°C	7 minutos		un ciclo

Se utilizaron 10 μL después de la amplificación de ADN para analizarlos en un gel de agarosa al 1%.

Secuenciación de ADN

A partir de los plásmidos purificados con el kit de QIAGEN mencionado, se realizó la secuenciación del ADN. Los resultados fueron analizados a partir de los datos mostrados en el programa Bioedit y comparados mediante BLAST con la secuencia referencia de Cry1Ac (M11068.1).

Obtención de la suspensión de espora-cristal

Las cepas de *B. thuringiensis* transformadas con las construcciones realizadas fueron sembradas en placas con medio HCT sólido y LB sólido con eritromicina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron a 30 °C durante 72 horas para favorecer la esporulación de las bacterias y la formación de cristales de proteína. Mediante revisión al microscopio

(con un objetivo de 100X) se detectó si las bacterias esporuladas producían los cristales bipiramidales típicos de *B. thuringiensis*. La biomasa de cada placa de petri fue colectada, mediante raspado, en un tubo eppendorf de 1.5 mL con 1 mL de agua estéril con PMSF 1mM para inhibir proteasas. Se agitaron con un vortex hasta obtener una suspensión de esporas y cristales. Se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos y se separó el botón celular del sobrenadante. Se realizó un lavado de cada fracción con agua estéril con PMSF 1mM y se repitió el paso de centrifugación y se observaron al microscopio para determinar la presencia de cristales. Las muestras fueron mantenidas a 4 °C hasta el momento de ser utilizadas en bioensayos o electroforesis y durante los experimentos fueron mantenidas en hielo.

Cuantificación de proteína

Se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976) para cuantificar proteína total. Se tomó una alícuota de la muestra (por ejemplo: spora-cristal) y se aforó a 800µL con agua destilada; se adicionaron 200µL del reactivo de Bradford (Bio Rad Protein Assay), se agitó la muestra y se dejó la reacción por cinco minutos. La absorbancia de las muestras fue determinada en un espectrofotómetro (Beckman Coulter) usando una longitud de onda de 595 nm. La concentración fue calculada a partir de una curva patrón realizada con albúmina sérica bovina (BSA).

Electroforesis de proteínas

Las muestras de spora-cristal fueron sometidas a ensayos de electroforesis utilizando geles de acrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes. Las muestras fueron adicionadas con mezcla lítica 4X y hervidas, en baño maría, por 3 minutos. La electroforesis se realizó en cámaras *Tall mighty smal* (Hoefer Scientific Instruments) con buffer de corrida 1X. Se cargaron en el gel y se aplicaron 10 mA hasta que el frente de corrida llegó al gel separador, posteriormente se aplicaron 20 mA hasta que el frente de corrida salía del gel. El gel se enjuagó con agua destilada tres veces durante 5 minutos, cambiando el agua cada vez, y se tiñó con el colorante Coomassie (Bio Rad) hasta observar bandas o se utilizó para la transferencia de proteínas para hacer *Western blot*.

Detección de proteínas mediante Western blot

Las proteínas separadas mediante electroforesis en gel de acrilamida al 10% (SDS-PAGE), fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham Biosciences) en una cámara de transferencia (Hoefer Scientific Instruments) con 800 mL de buffer aplicando 350 mA durante una hora.

La membrana fue lavada con buffer PBS 1X durante 5 minutos y después se bloqueó con una mezcla al 5% de leche descremada (en polvo) en PBS con Tween 20 al 0.05% durante 60 minutos. Se lavó la membrana cuatro veces con buffer PBS-

Tween y se puso a incubar con una dilución 1.5:30,000 de un primer anticuerpo policlonal de conejo anti-Cry1Ac durante 1 hora.

Se volvió a lavar la membrana cuatro veces con buffer PBS-Tween y ahora se incubó con una dilución de 1:30,000 de un segundo anticuerpo de cabra anti-anticuerpo de conejo acoplado a peroxidasa (Zymed) durante 40 minutos.

Se lavó la membrana como en pasos anteriores y se le dio un lavado final de 10 minutos sólo con PBS 1X. La membrana fue incubada con luminol del módulo *Super Signal Chemiluminiscent Substrate* (Pierce) agitándola ligeramente durante 1 minuto. Mediante el uso de films para quimioluminiscencia (Amersham Hyperfilm, GE Healthcare) y reactivos revelador y fijador (Kodak, GBX), se detectó la señal en cuarto oscuro.

Bioensayos de toxicidad en larvas de primer estadio de M. sexta

Se realizaron utilizando larvas de *Manduca sexta*, en su primer estadio de crecimiento, colocadas en placas con 24 pozos y una dieta artificial (una larva por pozo). El área de cada pozo fue de 2 cm² en los cuales se distribuyó una porción de la dieta que representaba la mitad de la capacidad del pozo. La dieta fue adicionada con tetraciclina y metilparabeno para evitar la contaminación por microorganismos.

Se utilizaron varias concentraciones de cada proteína mutante, como espora-cristal. Las concentraciones aplicadas fueron de 0.1 ng/cm², 0.5 ng/cm², 2.0 ng/cm², 10 ng/cm², 50 ng/cm², 500 ng/cm², 1000 ng/cm², 2000 ng/cm², 5000 ng/cm² y 10,000 ng/cm². Cada placa tuvo la misma concentración en sus 24 pozos mediante la adición de 35µL de la dilución de espora-cristal con agua esterilizada. Una vez adicionados y esparcidos los 35µL en los pozos, se dejaron secar completamente para después colocar las larvas. Las placas fueron cubiertas con plástico adherente y la tapa de la placa para ser mantenidas durante 7 días a temperatura ambiente, con ciclos de luz y oscuridad propios del día y la noche y con humedad ambiental.

Después de los 7 días se cuantificó el número de larvas muertas y se determinó el porcentaje de mortandad. Se utilizó agua esterilizada para una placa de control negativo y el mismo rango de concentración de proteínas Cry1AcMod y Cry1Ac silvestre como controles positivos.

Resultados

Construcción de mutantes de la toxina Cry1Ac con supresiones en el extremo N-terminal

Se plantearon dos estrategias para obtener las mutantes de la toxina Cry1Ac. La primera de ellas implicaba la ligación de tres fragmentos con el vector pHT315: el fragmento con la región promotora de la transcripción, el fragmento con la secuencia de la toxina (de acuerdo la construcción) y el fragmento con la secuencia del extremo carboxilo terminal que incluía al terminador.

La segunda estrategia consistía en la obtención previa, mediante un PCR denominado de ensamble, de un fragmento de ADN que incluyera la secuencia promotora (*megaprimer*) junto con la secuencia de la toxina modificada. Dicho fragmento ensamblado sería ligado con el segmento del C-terminal en el vector pHT315 específico para *B. thuringiensis*. En las siguientes figuras se muestra un esquema general de cada estrategia:

Estrategia 1: Tres fragmentos

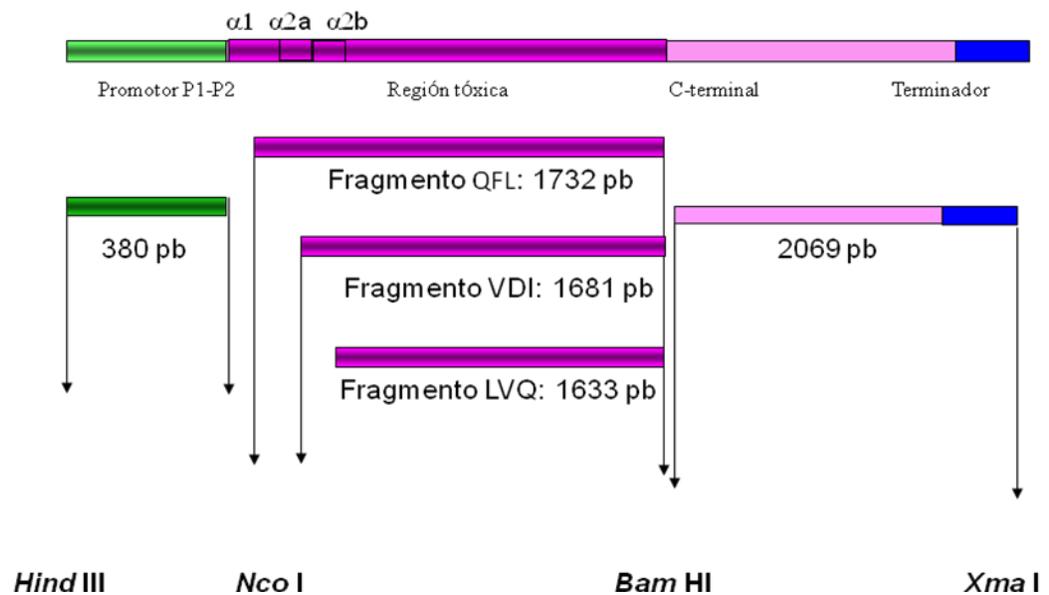


Figura 14. Estrategia de tres fragmentos. En la figura se muestran todos los fragmentos implicados en la construcción de las toxinas mutantes Cry1Ac QFL, Cry1Ac VDI y Cry1Ac LVQ así como los sitios de restricción que generarían los extremos cohesivos para ligación. Cada construcción fue clonada en el vector pHT315 específico para *B. thuringiensis*.

Estrategia 2: Megaprimer

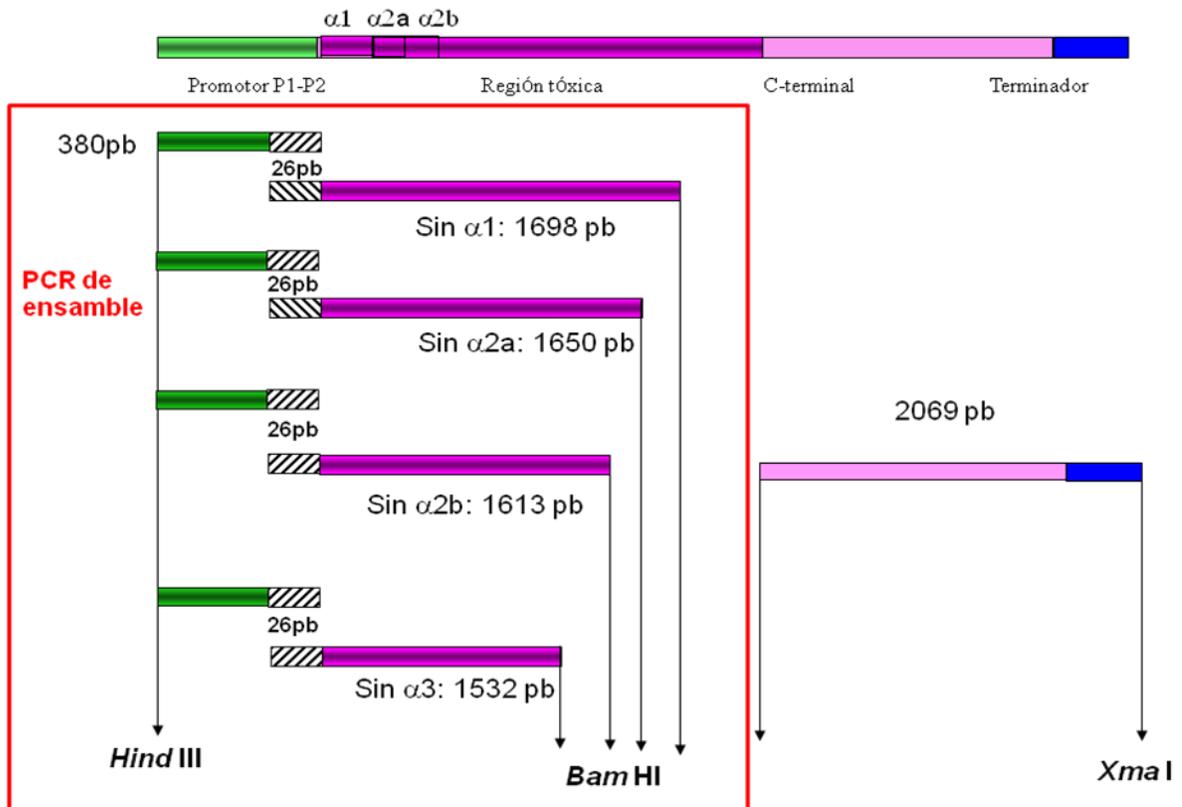


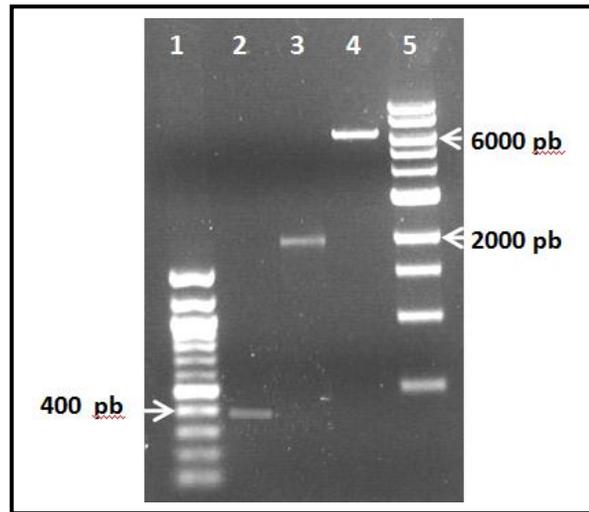
Figura 15: Estrategia con *megaprimer*. En la figura se muestran los dos fragmentos implicados en la construcción de las toxinas mutantes Cry1Ac sin hélice $\alpha 1$, sin hélice $\alpha 2a$, sin hélice $\alpha 2b$ y sin hélice $\alpha 3$ así como los sitios de restricción que generarían los extremos cohesivos para ligación. Nótese que uno de los fragmentos se generó al ensamblar el fragmento de la región promotora con el fragmento de la región de la toxina, según el caso. Cada construcción fue clonada en el vector pHT315 específico para *B. thuringiensis*.

Obtención de los fragmentos para ligación mediante ensayos de PCR.

a) Estrategia uno.

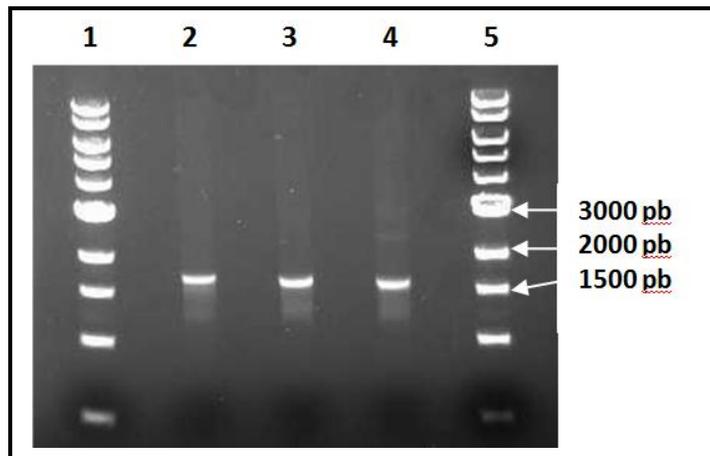
Mediante ensayos de PCR se amplificaron los fragmentos correspondientes a la región promotora y al C-terminal, obteniéndose bandas únicas del tamaño esperado para cada fragmento. El vector pHT315 se extrajo de un cultivo líquido de células de *E. coli* y se digirió con las enzimas *Hind* III/*Xma* I para abrirlo. A continuación se muestran los fragmentos mencionados ya purificados.

Pozo	Muestra y tamaño (pb)
1	M.M.M. de 100 pb
2	Promotor: 380 pb
3	C-terminal: 2069 pb
4	pHT315 digerido: 6500 pb
5	M.M.M de 1 Kb



También se obtuvieron los productos de PCR de la región de la toxina para las construcciones de Cry1Ac: QFL, VDI y LVQ:

Pozo	Muestra y tamaño (pb)
1	M.M.M. de 1 Kb
2	Fragmento QFL: 1732pb
3	Fragmento VDI: 1681 pb
4	Fragmento LVQ: 1633 pb
5	M.M.M. de 1 Kb

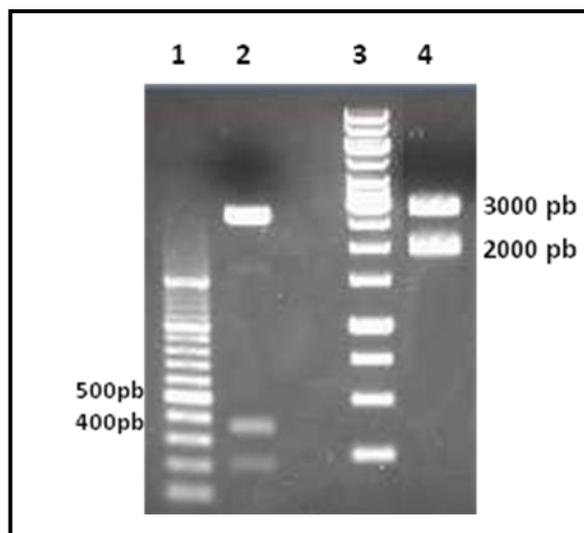


Subclonación de los productos de PCR en el vector pJET1.2/blunt

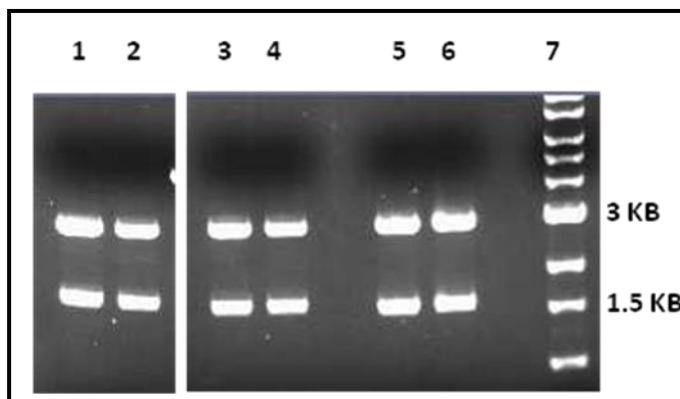
Los productos de PCR de los fragmentos de Cry1Ac (región promotora, C-terminal, QFL, VDI y LVQ) se purificaron mediante el *MinElute PCR purification kit* de QIAGEN y su concentración se estimó para llevar a cabo su clonación en el vector pJET1.2/blunt. Se seleccionó colonias positivas mediante PCR de colonias de *E. coli* y se corroboró el resultado mediante ensayos de digestión con enzimas de restricción de los plásmidos purificados a partir de cultivos líquidos. Adicionalmente se secuenció el ADN de los insertos.

A continuación, se muestra la liberación de los fragmentos de región promotora, C-terminal y fragmentos de región tóxica mediante enzimas de restricción:

Pozo	Muestra
1	M.M.M. de 100 pb
2	Plásmido con región promotora digerido
3	M.M.M. de 1 Kb
4	Plásmido con C-terminal digerido



Pozo	Muestra
1	Plásmido con QFL digerido
2	Plásmido con QFL digerido
3	Plásmido con VDI digerido
4	Plásmido con VDI digerido
5	Plásmido con LVQ digerido
6	Plásmido con LVQ digerido
7	M.M.M. de 1 Kb



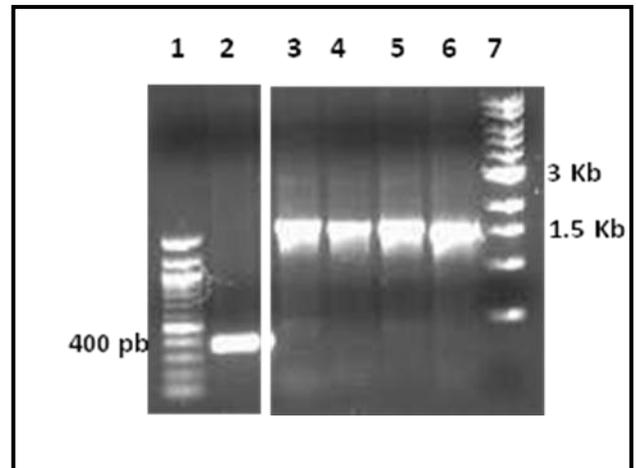
En todos los casos la banda de mayor tamaño (cerca a 3 Kb) corresponde al vector pJET1.2 mientras que la banda de menor tamaño consiste en el inserto liberado. En el caso del fragmento con los promotores, la tercera banda (menor a 300 pb) corresponde a un fragmento del vector generado durante la digestión.

b) Estrategia dos.

Obtención del megaprimer y los fragmentos de toxina.

Se obtuvo el fragmento que contenía la región promotora de la transcripción así como los fragmentos de región tóxica que serían utilizados para generar las construcciones de Cry1Ac sin hélice $\alpha 1$, sin hélice $\alpha 2a$, sin hélice $\alpha 2b$ y sin hélice $\alpha 3$. En seguida, se presentan las bandas correspondientes en un gel de agarosa.

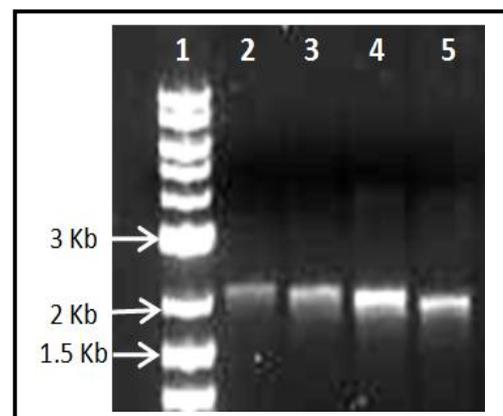
Pozo	Muestra y tamaño (pb)
1	M.M.M. de 100 pb
2	Megaprimer: 380 pb
3	Sin $\alpha 1$: 1698 pb
4	Sin $\alpha 2a$: 1650 pb
5	Sin $\alpha 2b$: 1614 pb
6	Sin $\alpha 3$: 1533 pb
7	M.M.M de 1 Kb



PCR de ensamble

Para esta reacción se utilizaron el fragmento del *megaprimer* y los de la toxina Cry1Ac (sin hélice $\alpha 1$, sin hélice $\alpha 2a$, sin hélice $\alpha 2b$ y sin hélice $\alpha 3$, según el caso) para generar uno solo que tuviera la región promotora y la región de toxina correspondiente. Las bandas se extrajeron de geles de agarosa ya que presentaban bandas contaminantes. A continuación, se muestran ya purificadas.

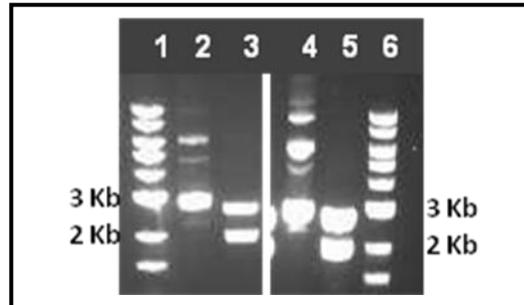
Pozo	Muestra y tamaño (pb)
1	M.M.M 2 log (100-10,000 pb)
2	Promotor-sin $\alpha 1$: 2052 pb
3	Promotor-sin $\alpha 2a$: 2004 pb
4	Promotor-sin $\alpha 2b$: 1967 pb
5	Promotor-sin $\alpha 3$: 1886 pb



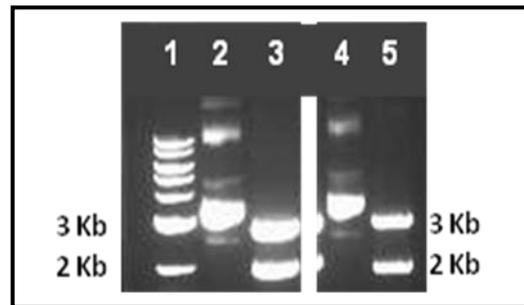
Subclonación de los productos de PCR de ensamblaje en pJET1.2/blunt

Abajo se muestran los plásmidos obtenidos digeridos con enzimas de restricción para liberar el inserto promotor-toxina correspondiente (fragmentos ensamblados).

Pozo	Muestra
1 y 6	M.M.M. de 1Kb
2	Plásmido si digerir (sin $\alpha 1$)
3	Plásmido digerido (sin $\alpha 1$)
4	Plásmido sin digerir ($\alpha 2a$)
5	Plásmido digerido ($\alpha 2a$)



Pozo	Muestra
1	M.M.M. de 1 Kb
2	Plásmido sin digerir ($\alpha 2b$)
3	Plásmido digerido ($\alpha 2b$)
4	Plásmido sin digerir ($\alpha 3$)
5	Plásmido digerido ($\alpha 3$)

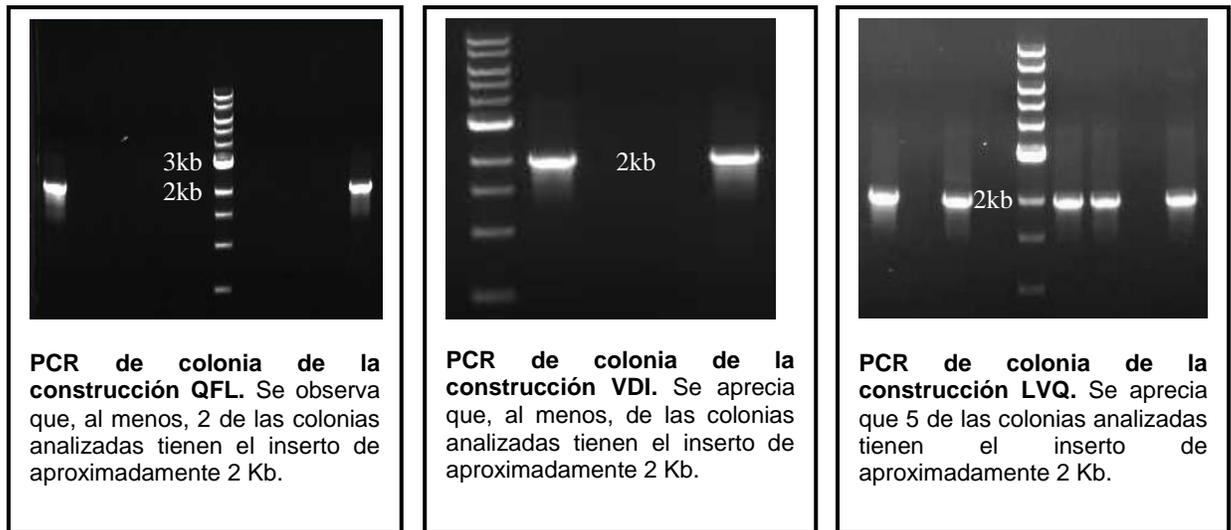


La banda del vector es de un tamaño cercano a 3 Kb mientras que la banda de los insertos es cercana a 2 Kb

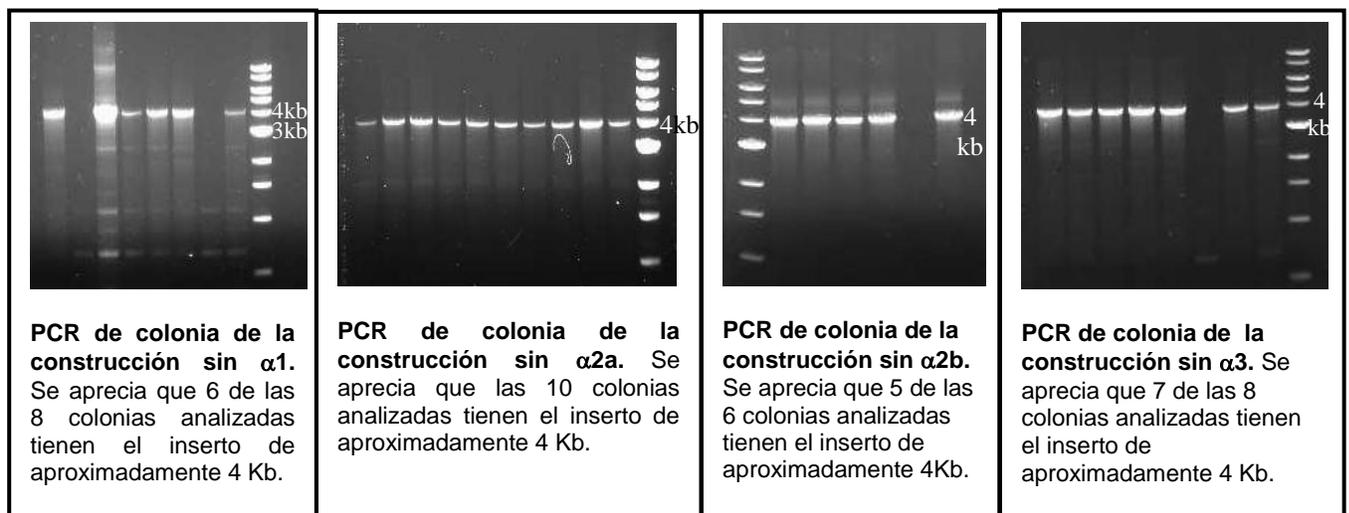
Detección de clonas de *E. coli* positivas mediante PCR de colonia

Las colonias de células *E. coli* XL1Blue que crecían a partir de cada electroporación se analizaron mediante PCR. Los oligonucleótidos utilizados amplificarían un fragmento de ADN, representativo, que nos indicaría si el vector contenía el inserto deseado.

Para el caso de las construcciones de Cry1Ac QFL, VDI y LVQ esperábamos un fragmento de tamaño cercano a 2 Kb, que implicaría la presencia del fragmento de los promotores unido al de la toxina (consideramos en ese caso que el inserto estaba completo). A continuación se muestra los resultados obtenidos. El marcador de masa molecular utilizado fue de 1 Kb.



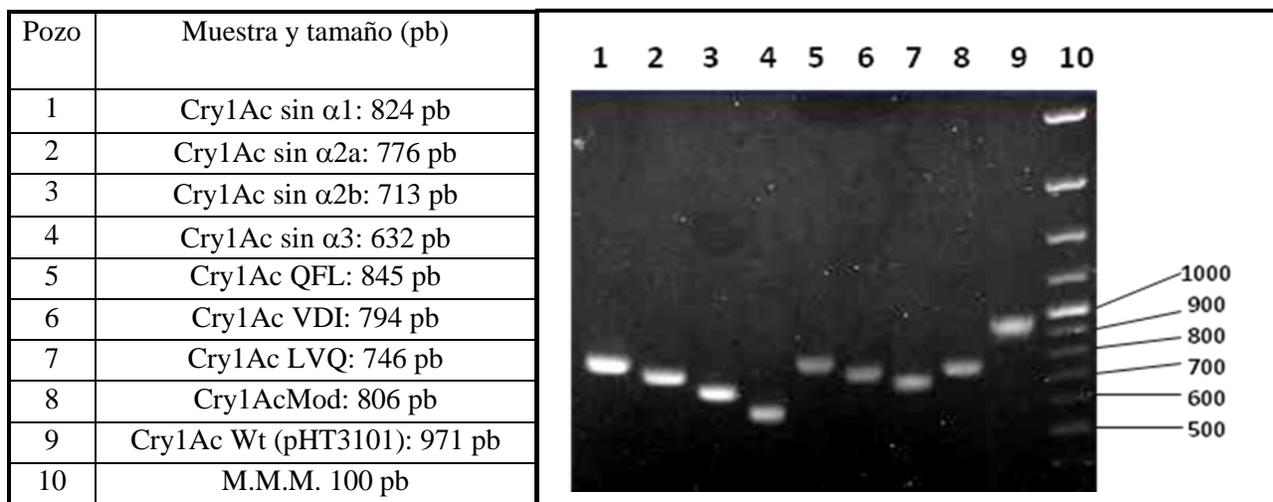
En el caso de las construcciones de Cry1Ac sin hélice $\alpha 1$, sin hélice $\alpha 2a$, sin hélice $\alpha 2b$ y sin hélice $\alpha 3$ esperábamos un fragmento de tamaño cercano 4 Kb que implicaría la presencia del inserto completo (promotor-toxina/C-terminal) en el vector. A continuación se muestran los resultados obtenidos.



Se extrajo y se purificó el plásmido construido de todas las clonas con inserto. El inserto se secuenció y se analizó en su totalidad para elegir a las clonas positivas, es decir, los genes modificados de casi 4000 pb, clonados en pHT315 fueron secuenciados para cada mutante. El ADN plasmídico de cada clona positiva se utilizó para transformar células competentes de calcio de *E. coli* (*dam*⁻).

Detección de los plásmidos construidos en la cepa acristalífera de B. thuringiensis transformada

Se transformó, mediante electroporación, la cepa acristalífera de *Bacillus thuringiensis*, con los plásmidos construidos. Para corroborar la presencia del plásmido introducido en las bacterias, se realizaron ensayos de PCR de colonia. Dado que se utilizaron los mismos oligonucleótidos, esperábamos observar una diferencia sustancial, e indicativa, en el tamaño de los fragmentos amplificados (en función de cada construcción). Se incluyeron (como controles positivos) bacterias de *B. thuringiensis* que tuvieran el plásmido de Cry1AcMod y el pHT3101, respectivamente. A continuación, se demuestra la presencia de los plásmidos construidos:



Es importante destacar la coincidencia entre el peso esperado y la ubicación de cada fragmento en el gel de agarosa con respecto al marcador de masa molecular. Aunado a que las secuencias de ADN eran correctas, este resultado permitía corroborar que las células de la cepa acristalífera estuvieran transformadas con nuestros plásmidos construidos.

Caracterización bioquímica de las proteínas mutantes

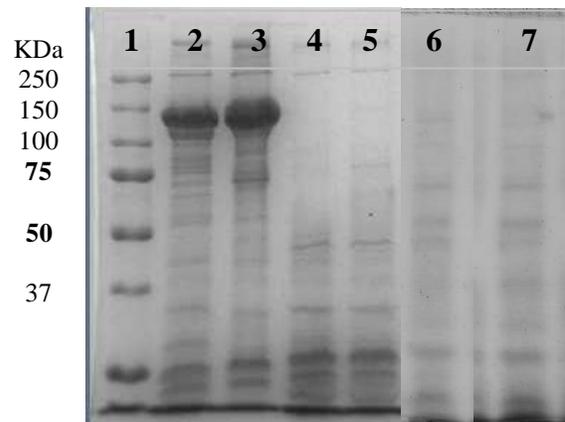
Análisis de la formación de protoxina mediante SDS-PAGE

El primer paso en el estudio de las proteínas mutantes fue la detección de cristales de protoxina, como se menciona en la sección de materiales y métodos. En este punto nos encontramos con que las proteínas mutantes, al parecer, generaban un cristal muy pequeño y amorfo, a diferencia de la Cry1Ac silvestre que produce un cristal bipiramidal grande (del tamaño de la espora). Estos cristales se analizaron mediante *SDS-PAGE* y *Western blot* y ahí comprobamos que estaban afectadas en la producción de protoxina (130 kDa).

Dado que las mutantes de Cry1Ac sin hélice $\alpha 1$, sin hélice $\alpha 2a$, sin hélice $\alpha 2b$ y sin hélice $\alpha 3$ se obtuvieron primero, se empezó a trabajar con estas para evaluar sus características.

A continuación se muestra un gel de acrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie donde se observa la protoxina de 130 KDa tanto en la Cry1Ac silvestre como en la Cry1AcMod. No se aprecia protoxina en los carriles de las proteínas sin hélice $\alpha 1$, sin hélice $\alpha 2a$, sin hélice $\alpha 2b$ y sin hélice $\alpha 3$. Se utilizaron muestras de espora-cristal.

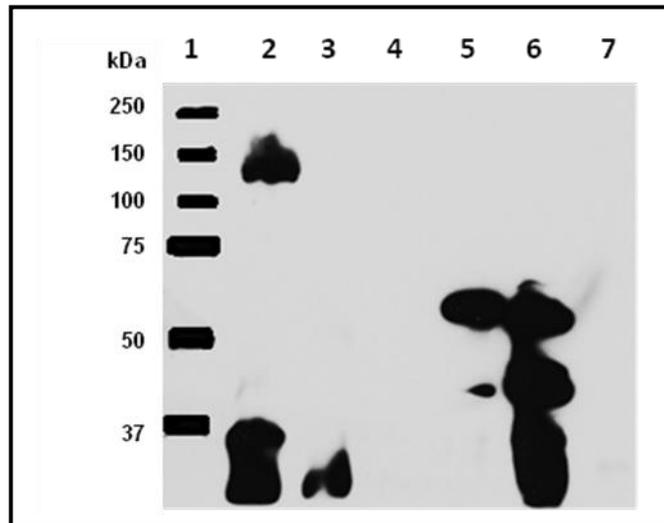
Carril	Muestra
1	Marcador de masa molecular
2	Cry1Ac wt
3	Cry1AcMod
4	Cry1Ac sin $\alpha 1$
5	Cry1Ac sin $\alpha 2a$
6	Cry1Ac sin $\alpha 2b$
7	Cry1Ac sin $\alpha 3$



Es importante mencionar que estas cepas transformadas se sembraron e incubaron hasta la esporulación en medio HCT con eritromicina, pues es el que se utiliza comúnmente para dicho fin, debido a sus características nutricionales. Este resultado nos hacía pensar que ninguna de las cepas transformadas con estos plásmidos fue capaz de producir protoxina, o al menos en una cantidad detectable mediante la tinción con coomasie.

Al analizar las muestras de espora-cristal mediante *Western blot*, con un anticuerpo policlonal específico contra la toxina de Cry1Ac, se observaron bandas en las muestras de las mutantes sin hélice $\alpha 2a$ y sin hélice $\alpha 2b$. Por el tamaño (60 kDa) se podría pensar que eran toxinas truncadas (como, por ejemplo, si se hubiera procesado el extremo C-terminal). En el carril de Cry1AcMod se observa una banda de 130 kDa que correspondería a la protoxina.

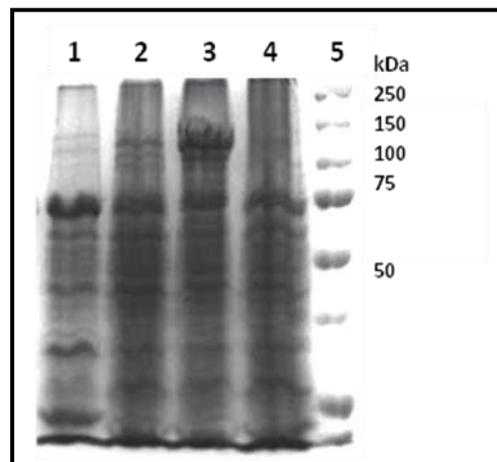
Carril	Muestra
1	Marcador de masa molecular
2	Cry1AcMod
3	Cepa acristalífera
4	Cry1Ac sin $\alpha 1$
5	Cry1Ac sin $\alpha 2a$
6	Cry1Ac sin $\alpha 2b$
7	Cry1Ac sin $\alpha 3$



Por lo anterior, consideramos que estas proteínas podrían estar afectadas en su plegamiento y estabilidad, quedando más expuestas a proteasas propias de la célula bacteriana.

Se realizó un intento más para ver si podría haber producción de protoxina por parte de las cepas transformadas al utilizar el medio LB con eritromicina en lugar del medio HCT, pues en el grupo se observó que otras proteínas mutantes distintas (de Cry1Ab) generaban cristales en medio LB pero no en medio HCT. El resultado se muestra a continuación:

Carril	Muestra
1	Cry1Ac sin $\alpha 1$
2	Cry1Ac sin $\alpha 2a$
3	Cry1Ac sin $\alpha 2b$
4	Cry1Ac sin $\alpha 3$
5	M.M.M.



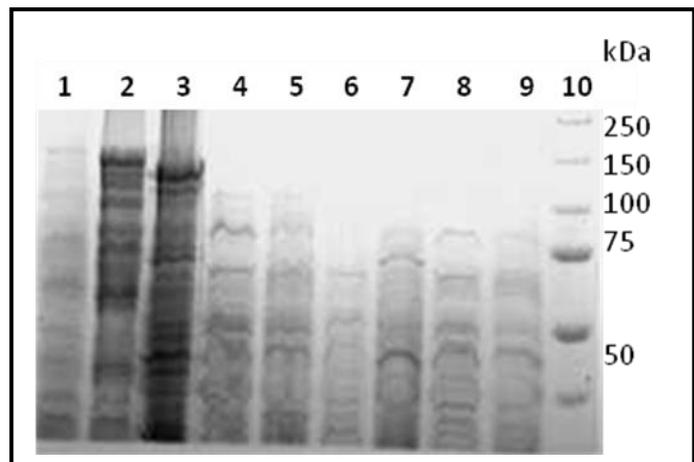
Se puede observar que al utilizar medio LB sólido la mutante Cry1Ac sin hélice $\alpha 2b$ es la única que generó protoxina de un peso cercano a 130 kDa, como ocurre con la proteína silvestre y la Cry1AcMod (no mostradas en este gel). Cabe decir que optamos por trabajar con medio sólido ya que nos permite recolectar prácticamente toda la biomasa (espora-cristal) fácilmente y no se requieren lavados, como ocurre al trabajar con medio líquido.

Es importante mencionar que el medio LB es rico en nutrientes y se ha reportado que en esas condiciones se expresan menos proteasas durante la fase de esporulación (Levisohn y Aronson, 1967) lo que hace probable que dicha toxina sea menos susceptible de degradación.

De hecho, dicha mutante fue la única que generó protoxina, aún cuando no mostró cristales bipiramidales al microscopio. Las otras mutantes: QFL, VDI y LVQ no produjeron cristales ni protoxina.

En la imagen siguiente, se muestra un gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie donde se utilizaron muestras de espora-cristal de todas las cepas obtenidas. Se puede apreciar que la protoxina de Cry1Ac sin hélice $\alpha 2b$ es un poco menor de 130 kDa (comparada con la silvestre del carril 2), esto se debería a los aminoácidos que le fueron quitados.

Pozo	Muestra (espora-cristal)
1	Cepa acristalífera
2	Cry1Ac silvestre
3	Cry1Ac sin $\alpha 2b$
4	Cry1Ac sin $\alpha 1$
5	Cry1Ac sin $\alpha 2a$
6	Cry1Ac sin $\alpha 3$
7	Cry1Ac QFL
8	Cry1Ac VDI
9	Cry1Ac LVQ
10	M.M.M.



Resumiendo, sólo al incubar hasta esporulación (en placas de petri con medio LB sólido con eritromicina) las cepas transformadas, se notó la presencia de protoxina en la mutante Cry1Ac sin hélice $\alpha 2b$ (mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie), aún sin que generara cristales visibles al microscopio.

Bioensayos

A pesar de los resultados obtenidos, se realizaron bioensayos utilizando muestras de biomasa esporulada (de cada cepa transformada con los plásmidos generados) manejando diferentes concentraciones (mencionadas en la sección de materiales y métodos), pensando que pudiera haber alguna actividad tóxica por parte de las proteínas truncadas, aún cuando no las hubiéramos detectado en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes.

Todas las larvas en cuya dieta se adicionó la toxina Cry1Ac *wild type* (control positivo) murieron a partir de la concentración de 10 ng/cm² mientras que aquellas a las que se les dio Cry1AcMod murieron a partir de 500 ng/cm². Las larvas del control negativo sobrevivieron.

No se observó efecto tóxico en las demás larvas (en cuya dieta se había adicionado la biomasa esporulada con nuestras construcciones de Cry1Ac), ya que continuaron con su crecimiento normal hasta una concentración de 10,000 ng/cm² (máxima dosis que utilizamos).

Discusión

Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* representan una alternativa biotecnológica viable para el control de plagas de insectos de importancia en agricultura y silvicultura así como de vectores de enfermedades en humanos (Bravo et al., 2005); por lo tanto, las investigaciones orientadas hacia la comprensión del mecanismo de acción de dichas toxinas son fundamentales para continuar con su aplicación en los campos de cultivo, así como para una posible mejoría en su actividad insecticida.

El principal obstáculo para la eficacia a largo plazo de las toxinas Cry es la evolución de resistencia en las plagas de insectos (Gahan *et al.*, 2001, Tabashnik, 1994). Las toxinas Cry1A reconocen el dominio extracelular de proteínas tipo caderina que atraviesan la membrana celular del intestino medio de las larvas de insectos (Vadlamudi *et al.*, 1995). La alteración de la interacción de la toxina de Bt con los receptores del intestino medio es el mecanismo de resistencia más común en insectos (Ferré *et al.*, 2002).

La obtención, por parte de nuestro grupo, de toxinas Cry1AMod capaces de formar oligómero y ser tóxicas contra insectos resistentes, cuyo primer receptor (tipo caderina) está afectado, generó la posibilidad de nuevos planteamientos para la producción de una nueva generación de toxinas Cry (modificadas) capaces de contender contra el desarrollo de resistencia en las plagas de importancia agrícola.

En el presente trabajo, en función del resultado obtenido con las toxinas Cry1AcMod y Cry1AbMod (Soberón *et al.*, 2007), se planteó la construcción de varios plásmidos que contengan la toxina Cry1Ac con supresiones en la región hacia el extremo N-terminal, correspondiente al dominio I de la proteína, con la finalidad de evaluar su efecto en la toxicidad en insectos susceptibles y resistentes. En el diseño de los plásmidos se tuvieron ciertas consideraciones: a) La eliminación de regiones que corresponden a hélices α , pues queríamos determinar su influencia en la oligomerización y la toxicidad de Cry1Ac; b) El artículo de Lightwood *et al.* del 2000 en donde se comparó la diferencia en el procesamiento proteolítico de Cry1Ac utilizando el jugo gástrico de dos larvas de insectos, una susceptible y otra resistente a dicha toxina. En dicho artículo, y como se mencionó en los antecedentes, se proporciona una tabla de la secuenciación del N-terminal de los productos de la digestión de Cry1Ac. El sitio donde inician las construcciones Cry1Ac sin hélice α_1 , sin hélice α_{2a} y la Cry1Ac VDI coincide con lo reportado en esa referencia. Es importante mencionar que el sitio de inicio de la Cry1AcMod también aparece en esa tabla; y finalmente c) La posible importancia de ciertos aminoácidos aromáticos (Phe45, Phe50, Phe56, Trp65 y Trp73) cercanos a los sitios donde inician las mutantes QFL, VDI y LVQ.

En la siguiente figura, se muestra una parte de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región de las hélices alfa, en el dominio I, para ubicar el sitio donde iniciaría cada proteína obtenida a partir de los plásmidos construidos:

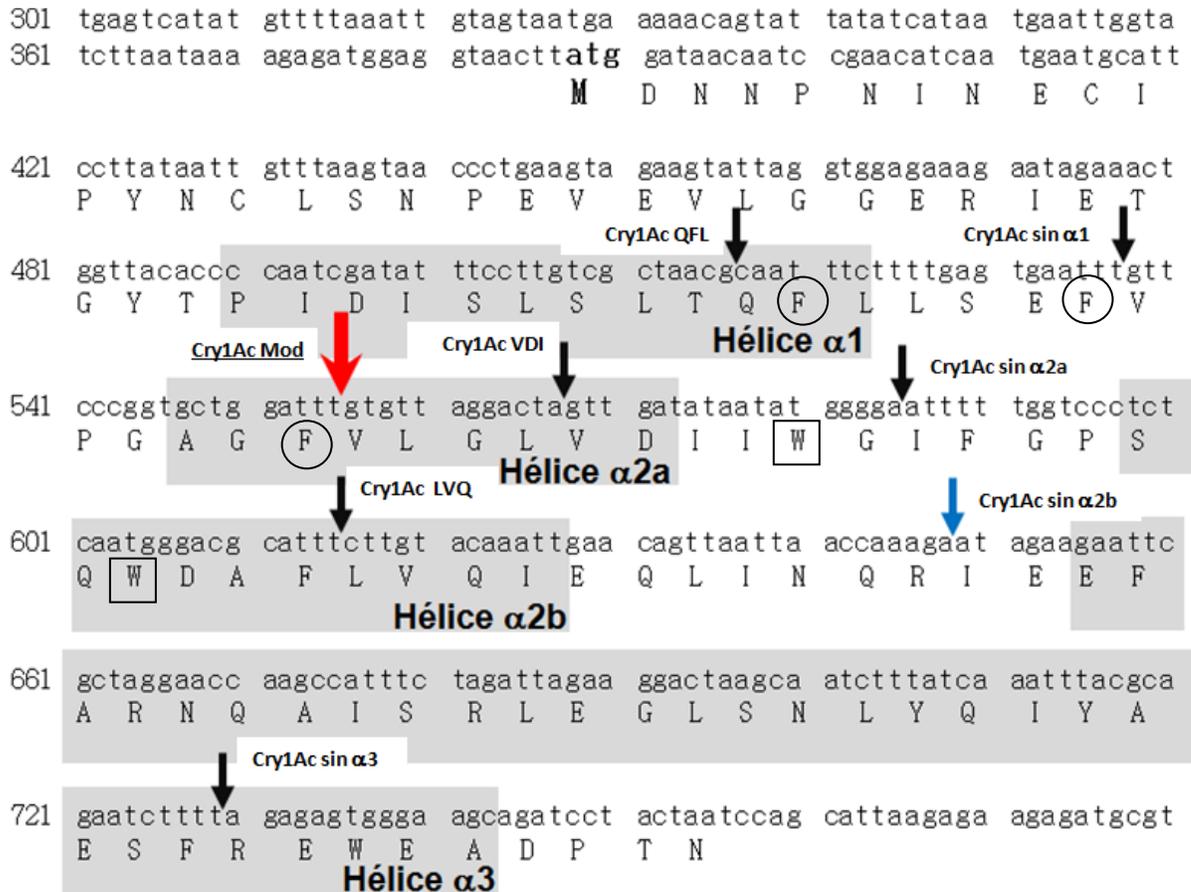


Figura 16: Sitios de inicio de las toxinas Cry1Ac obtenidas. Se muestra la secuencia nucleotídica (y aminoácidos asociados) de una parte del dominio I de Cry1Ac donde se resaltan las regiones que corresponderían a las primeras tres hélices alfa. Las flechas indican el sitio de inicio de las proteínas modificadas (después de la metionina inicial). La flecha azul indica el sitio donde iniciaría la proteína Cry1Ac sin hélice $\alpha 2b$ (única que generó protoxina visible en gel de acrilamida teñido con Coomassie). La flecha en rojo indica el sitio donde inicia la toxina Cry1AcMod. En círculos se encerraron las tres fenilalaninas que podrían estar interactuando entre sí y en cuadros se encerraron los dos triptófanos que podrían estar interactuando entre sí.

Se utilizaron dos estrategias que implicaban la ligación (a partir de sitios cohesivos generados por digestiones con enzimas de restricción) de varios fragmentos de ADN; por un lado, la ligación del fragmento de los promotores de la transcripción, el fragmento de la región tóxica y el fragmento del C-terminal con terminador con el vector pHT315 (específico para *B. thuringiensis*). Por otro lado, la ligación del fragmento obtenido mediante un ensayo de PCR denominado “de ensamble” (que incluyera la

región de los promotores y la región correspondiente de la toxina), y el fragmento del C-terminal con terminador con el vector pHT315.

El análisis de la secuenciación de ADN de los todos los insertos en el vector pHT315 mostró resultados positivos, es decir, se logró la obtención de todas las construcciones planteadas; sin embargo, solamente la variante Cry1Ac sin hélice $\alpha 2b$ fue capaz de producir protoxina, a pesar de no generar cristales bipiramidales visibles al microscopio. Adicionalmente, ninguna de las construcciones fue capaz de generar una proteína tóxica contra larvas susceptibles de *M. sexta*.

Como se mencionó en los antecedentes, la única estructura cristalográfica que se tiene reportada de una protoxina Cry (la de Cry2Aa) permitió plantear la posible función de los 49 aminoácidos del N-terminal de la proteína que son eliminados al activarla con proteasas como tripsina. La remoción de dicho fragmento mediante proteólisis permitiría la exposición de regiones de la toxina entre las que destaca la región de reconocimiento al receptor (Morse *et al.*, 2001), es decir, los primeros 49 residuos antes de la hélice $\alpha 1$ estarían bloqueando el sitio de unión al receptor. Las proteasas del intestino de las larvas cortan esa región y permiten que la toxina se pueda unir a su receptor. Cabe mencionar que la región que queda expuesta es una región hidrofóbica de 800 \AA^2 . A partir de lo anterior, Morse *et al.* (2001) proponen que la oclusión del parche hidrofóbico previene la agregación inespecífica de la toxina consigo misma o con otras proteínas de la bacteria. Por otro lado, los aminoácidos del N-terminal podrían desempeñar un rol en la formación de las inclusiones cristalinas estables.

En el caso de la toxina Cry4Ba, activa contra dípteros, Boonserm *et al.* (2005) reportaron que la eliminación de las hélices $\alpha 1$ hasta la $\alpha 2b$ (debida a proteólisis durante la cristalización) no afectó su toxicidad; permitiendo que se concluyera que dichas hélices alfa son innecesarias para su función. Es importante destacar que dicha remoción también descubrió una región hidrofóbica que permitió que el N-terminal de la hélice $\alpha 3$ de tres moléculas formara contactos de van der Waals entre ellas, generándose estructuras artificiales de trímero en el cristal romboédrico.

De lo anterior, podemos concluir que la eliminación de diversas regiones codificantes para los aminoácidos hacia el N-terminal parece comprometer seriamente la estabilidad de la toxina Cry1Ac, dado que las regiones que quedan expuestas son hidrofóbicas. De no ocurrir un arreglo conformacional, como la asociación de moléculas en el caso de la toxina Cry4Ba, las toxinas simplemente no pueden ser funcionales. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, nos hacen suponer que las proteínas producidas por los plásmidos construidos estarían severamente afectadas en su plegamiento y estabilidad. Quizá desde las primeras etapas de su traducción estarían ocurriendo interacciones inadecuadas entre los aminoácidos de la cadena polipeptídica en formación, lo que generaría una proteína no funcional que sería degradada por proteasas propias de *B. thuringiensis*. En el caso particular de Cry1Ac sin hélice $\alpha 2b$, creemos que la protoxina sería más susceptible de un procesamiento proteolítico (por parte de las enzimas del jugo gástrico de las larvas) siendo degradada, pues se

considera que dicha situación es una barrera contra la que las proteínas Cry deben contender para llevar a cabo su mecanismo de acción.

En relación a los aminoácidos aromáticos Phe45, Phe50, Phe56, Trp65 y Trp73 (cerca de los sitios donde inician las mutaciones QFL, VDI y LVQ), no pudimos determinar su trascendencia en la toxicidad de las proteínas dado que tampoco produjeron protoxina. En este caso, un estudio de mutagénesis sitio dirigida en la toxina Cry1Ac silvestre podría ser ilustrativo.

En otro contexto, en la introducción de esta tesis se mencionó que las toxinas Cry pertenecen a una clase de toxinas bacterianas conocidas como toxinas formadoras de poro (PFT por sus siglas en inglés) que se secretan como proteínas solubles en agua y que desarrollan cambios conformacionales enfocados a su inserción en las membranas celulares del hospedero. En el grupo de las toxinas formadoras de poro hélice- α , las regiones α -hélice forman el poro transmembranal. Dentro de este grupo se incluyen las toxinas Cry y la colicina. Las colicinas son PFTs producidas por *E. coli* y están destinadas para matar a otras *E. coli* blanco susceptibles. La bacteria que expresa la toxina también produce una proteína de inmunidad que la protege de la acción de la toxina (Cascales *et al.*, 2007). Un ejemplo de estas toxinas es la colicina Ia. Dicha proteína se conforma de tres dominios, a saber: un dominio de translocación, uno de enlace a receptor y un dominio formador del poro (Ghosh *et al.*, 1994). El dominio formador del poro se compone de un agrupamiento de 10 hélices α . Es un dominio globular con un núcleo hidrofóbico compuesto de una horquilla de hélices α (hélices 8 y 9). La estructura tridimensional de la forma soluble del dominio formador del poro de las colicinas A, E1 y N revela la misma arquitectura. Se considera que la formación de oligómeros es esencial para su función pero aún se carece de evidencia definitiva.

Es importante destacar la similitud que hay entre la estructuración del dominio formador del poro de las colicinas y la del correspondiente dominio en las toxinas Cry. A este respecto, resulta interesante mencionar un estudio realizado en el gen de la colicina A. En dicho trabajo se reporta que toda una serie de remociones y algunas mutaciones en la región codificante para el dominio formador del poro condujeron a la agregación de las proteínas en el citoplasma, evitando su secreción hacia el medio. La agregación de las moléculas de colicina en el citoplasma (observada mediante microscopía electrónica) resultó probablemente de un cambio en la orientación de las hélices y en la exposición de superficies hidrofóbicas hacia el solvente. Por otro lado, la eliminación de fragmentos en la región de las hélices α 4, α 5 y α 6 abolieron la actividad de la toxina (Baty *et al.*, 1987).

Lo anterior nos habla sobre el hecho de que al eliminar hélices α en un dominio formador de poro comprometemos drásticamente la actividad biológica de la proteína formadora de poro. Si bien es cierto que no todas las hélices α participan en la inserción en membrana o en la oligomerización, deberán tener alguna función específica en la estabilidad de la toxina. Con esto estaríamos observando que los genes de las toxinas Cry están sometidos a una gran presión selectiva que limita el tipo

de cambios “permitidos” que mantendrían una proteína con actividad biológica, en este caso insecticida. Las toxinas Cry1AMod demuestran la posibilidad de hacer modificaciones en el gen de las proteínas Cry y aun mantener toxinas activas; no obstante, dichos cambios tendrían que ser discretos y, probablemente, pocos.

Conclusiones

- Se logró la obtención de todos los plásmidos con los genes modificados de Cry1Ac planteados.
- La variante Cry1Ac sin $\alpha 2b$ fue la única capaz de producir protoxina, pero no fue tóxica en los bioensayos realizados.
- Consideramos que las proteínas modificadas están severamente afectadas en cuanto a su plegamiento y su estabilidad, lo que ocasiona su degradación en la propia bacteria de Bt.
- La toxina Cry1AcMod podría ser la mínima unidad suficiente que conserva su capacidad de formar oligómero y de ser tóxica contra insectos lepidópteros susceptibles y resistentes.

Perspectivas

- Analizar los parámetros termodinámicos teóricos de la estructura de la toxina Cry1AcMod, mediante programas computacionales, y comparar los resultados con los de las toxinas planteadas en este proyecto.
- Plantear nuevas construcciones basadas en estudios bio-informáticos (que involucren modelajes estructurales) para una predicción teórica de proteínas Cry1A estables, y probar algunas de estas nuevas construcciones experimentalmente.

Apéndice

1. Medios de cultivo.

Medio LB

Componente	gramos
Peptona	10.0
Extracto de levadura	5.0
NaCl	10.0

Disolver componentes con agitación y aforar a 1L de medio con agua destilada. Para medio sólido agregar 15g de agar.

Esterilizar en autoclave.

Medio BHI

Componente	gramos
Polvo de la infusión cerebro-corazón	37.0

Disolver componente con agitación y aforar a 1L de medio con agua destilada. Para medio sólido agregar 15g de agar.

Esterilizar en autoclave.

Medio HCT

Componente	gramos
Triptona	2.5
Casa-aminoácidos	1.0

Disolver componentes con agitación y aforar a 446 mL de medio con agua destilada.

Ajustar pH a 7.25 con KOH.

Para medio sólido agregar 7.5g de agar.

Esterilizar en autoclave.

Se preparan también las siguientes soluciones y se esterilizan en autoclave:

Solución I

Componente	gramos
KH ₂ PO ₄	6.8

Disolver componente con agitación y aforar a 100mL con agua destilada.

Solución II

Componente	gramos
MgSO ₄ *7H ₂ O	1.23
MnSO ₄ *H ₂ O	0.017
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0.14

Disolver componentes con agitación y aforar a 100mL con agua destilada.

Solución III

Componente	gramos
Fe(SO ₄)*7H ₂ O	0.2
H ₂ SO ₄ (1N)	10.0 mL

Disolver componentes con agitación y aforar a 100mL con agua destilada.

Solución IV

Componente	gramos
CaCl ₂ *2H ₂ O	1.47

Disolver componente con agitación y aforar a 100mL con agua destilada.

Solución de glucosa al 10%

Componente	gramos
Dextrosa	10.0

Disolver componente con agitación y aforar a 100mL con agua destilada.

Al momento de utilizar el medio, a una temperatura soportable por el dorso de la mano, se adicionan las soluciones (previamente esterilizadas en autoclave):

Solución	mL
I	25.0
II	0.5
III	5.0
IV	5.0
Glucosa 10%	15.0

Medio SOC

Para obtener este medio se debe preparar lo siguiente:

Medio SOB

Componente	gramos
Triptona	20.0
Extracto de levadura	5.0
NaCl	0.5
KCl	0.186

Disolver componentes con agitación en 950 mL de agua destilada.

Ajustar el pH a 7 con NaOH (5N).

Aforar volumen a 1L y esterilizar en autoclave.

Solución de MgCl₂ (1M)

Componente	gramos
MgCl ₂	9.5

Disolver componente con agitación y aforar a 100mL con agua destilada.

Solución de glucosa al 50%

Componente	gramos
Glucosa	50.0

Disolver componente con agitación y aforar a 100mL con agua destilada.

Para obtener el medio SOC, se adicionan 10mL de cada solución al litro de medio SOB y se mezclan.

2. Buffers.

TBE 10X

Componente	gramos
Tris	108.0
Ácido bórico	55.0
EDTA (0.5M, pH 8)	40.0 mL

Disolver componentes con agitación y aforar a 1L con agua destilada.

Filtrar con filtro de 0.45 µm.

TAE 50X

Componente	gramos
Tris	242.0
Ácido acético glacial	57.1 mL
EDTA (0.5M, pH8)	100.0 mL

Disolver componentes con agitación y aforar a 1L con agua destilada.

Filtrar con filtro de 0.45 µm.

Buffer de corrida 10X (Geles de acrilamida)

Componente	gramos
Glicina	144.0
Tris	30.0
SDS al 10%	10.0

Disolver componentes con agitación y aforar a 1L con agua destilada.

PBS 10X

Componente	gramos
NaH ₂ PO ₄	26.4
Na ₂ HPO ₄	47.2
NaCl	58.4

Disolver componentes con agitación, ajustar el pH a 7.2 con NaOH (5N) y aforar a 1L con agua destilada.

Filtrar con filtro de 0.45 µm.

Buffer de transferencia 1X

Componente	gramos
Tris	3.0
Glicina	14.4
Metanol absoluto	200.0 mL

Disolver componentes con agitación y aforar a 1L con agua destilada.

Buffer EB (para preparar células de *Bt* electrocompetentes)

Componente	gramos
Sacarosa	64.2
MgCl ₂	0.1

Disolver componentes con agitación y aforar a 300 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave.

3. Otros materiales utilizados.

Ampicilina (100 mg/mL)

En condiciones de esterilidad:

Disolver 1g de ampicilina en 10 mL de agua estéril.

Filtrar con filtro de 0.22 µm.

Almacenar en congelación hasta su uso.

Eritromicina (10 mg/mL)

En condiciones de esterilidad:

Disolver 0.1g de eritromicina en 5 mL de agua estéril con 5 mL de etanol absoluto.

Filtrar con filtro de 0.22 µm.

Almacenar en congelación hasta su uso.

Mezcla lítica 4X (10mL)

Componente	gramos
Glicerol	4.0 mL
Tris (0.5M, pH 6.8)	5.0 mL
SDS	0.4
2-mercapto etanol	1.0 mL

Adicionar azul de bromofenol con la punta de un palillo y mezclar.

Almacenar en congelación hasta su uso.

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APN	Aminopectidasa N
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bt-R1	Caderina de <i>Manduca sexta</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
FD	Faradio
GPI	Glucosilfosfatidil inositol
M.M.M.	Marcador de masa molecular
Mod	Modificada
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFT	Toxina formadora de poro
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonil

Bibliografía

- Aronson, A.I., Shai, Y.** 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.* 195, 1–8.
- Baty, D., Knibiehler, M., Verheij, H., Pattus, F., et al.** 1987. Site-directed mutagenesis of the COOH-terminal region of colicin A: Effect on secretion and voltage-dependent channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 1152-1156.
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D.J., Li, J.** 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* 348, 363–382.
- 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.
- Bravo, A., Sánchez, J., Kouskoura, T., Crickmore, N.** 2002. N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *B. thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. *J. Biol. Chem.* 277, 23985–23987.
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Zhuang, M., Gill, S.S., Soberón, M.** 2004. Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction with membrane microdomains. *Biochem. Biophys. Acta.* 1667, 38–46.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M.** 2005. *Bacillus thuringiensis* Mechanisms and Use In: *Comprehensive Molecular Insect Science.* Elsevier BV, Amsterdam, pp. 175-206.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M.** 2006. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon.* 49, 423-435.
- Cabiaux, V., Wolff, Ch., Ruyschaert, J.M.** 1997. Interaction with a lipid membrane: a key step in bacterial toxins virulence. *Int. J. Biol. Macromol.* 21, 285–298.
- Cascales, E., Buchanan, S.K., Duche, D., Kleanthous, C., Lloubes, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., Cavard, D.** 2007. Colicin biology. *Mircobiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 158-229.
- Chen, J., Hua, G., Jurat-Fuentes, J.L., Abdullah, M.A., Adang, M.** 2007. Synergism of *Bacillus thuringiensis* toxins by a fragment of a toxin-binding cadherin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 13901-13906.

- deMaagd, R.A., Kwa, M.S.G., van der Klei, H., Yamamoto, T., Schipper, B., Vlak, J.M., et al.** 1996. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ab results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62,1537–1543.
- deMaagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N.** 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17, 193–199.
- FAO.** 2003. Biotecnología agrícola para países en desarrollo: resultados de un foro electrónico.
- Ferré, J., van Rie, J.** 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 501-533.
- Gahan, L.J., Gould, F., Heckel, D.G.** 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293, 857–860.
- Ghosh, P., Mel, S.F., Stroud, R.M.** 1994. The domain structure of the ion channel-forming protein colicin Ia. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 1, 597-604.
- Gómez, I., Oltean, D.I., Sanchez, J., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M.** 2001. Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. *J. Biol. Chem.* 276, 28906–28912.
- Gómez, I., Miranda-Rios, J., Rudiño-Piñera, E., Oltean, D.I., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M.** 2002a. Hydrophobic complementarity determines interaction of epitope 869HITDTNNK876 in *Manduca sexta* Bt-R1 receptor with loop 2 of domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *J. Biol. Chem.* 277, 30137–30143.
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., Soberón, M.** 2002b. 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 Lett.* 513, 242-246.
- Gómez, I., Dean, D.H., Bravo, A., Soberón, M.** 2003. Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: Two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R1 receptor interact with loops a-8 and 2 in domain II of Cy1Ab toxin. *Biochem* 42, 10482–10489.
- Hua, G., Jurat-Fuentes, J.L., Adang, M.J.** 2004. Bt-R1a extracellular cadherin repeat 12 mediates *Bacillus thuringiensis* binding and cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 279, 28051–28056.

- Janmaat, A.F., Myers, J.H.** 2003. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. Proc. R. Soc. Lond. B. 270, 2263-2270.
- Jenkins, J.L., Dean, D.H.** 2000. Exploring the mechanism of action of insecticidal proteins by genetic engineering methods. In: Setlow, J.K. (Ed.), Genetic Engineering: Principles and Methods. Plenum Press, New York, p. 33.
- Jurat-Fuentes, J.L., Adang, M.J.** 2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. Eur. J. Biochem. 271, 3127–3135.
- Levisohn, S., Aronson, A.I.** 1967. Regulation of extracellular protease production in *Bacillus cereus*. Journal of Bacteriology. 93, 1023-1030.
- Li, J., Carrol, J., Ellar, D.J.** 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. Nature 353, 815-821.
- Lightwood, D.J., Ellar, D.J., Jarrett, P.** 2000. Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -endotoxin. Applied and Environmental Microbiology. 66, 5174-5181.
- MacIntosh, S.C., Kishore, G.M., Perlak, F.J., Marrone, P.G., Stone, T.B., Sims, S.R., et al.** 1990. Potentiation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity by serine protease inhibitors. J. Agric. Food Chem. 38,1145–1152.
- Mandal, C.C., Gayen, S., Basu, A., Ghosh, K.S., Dasgupta, S., Maiti, M.K., Sen, S.K.** 2007. Prediction-based protein engineering of domain I of Cry2Aa entomocidal toxin of *Bacillus thuringiensis* for the enhancement of toxicity against lepidopteran insects. Protein Engineering, Design and Selection. 20, 599-606.
- Miranda, R., Zamudio, F., Bravo, A.** 2001. Processing of Cry1Ab δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. Insect Biochem. Mol. Biol. 31, 1155-1163.
- Morin, S., Biggs, R.W., Shriver, L., Ellers-Kirk, C., Higginson, D., Holley, D., Gahan, Heckel, D.G., Carriere, Y., Dennehy, T.J., Brown, J.K., Tabashnik, B.E.** 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. Proc. Nat., Acad. Sci. 100, 5004–5009.
- Morse, R.J., Yamamoto, T., Stroud, R.M.** 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. Structure 9, 409-417.

- Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Darszon, A., de Maagd, R.A., Bakker, P., Soberón, M., Bravo, A.** 2006. Permeability changes of *Manduca sexta* midgut brush border membranes induced by oligomeric structures of different Cry toxins. *J. Membr. Biol.*, in press.
- Pardo-López, L., Muñoz-Garay, C., Porta, H., Rodríguez-Almazán, C., Soberón, M., Bravo, A.** 2008. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*. 30, 589-595.
- Parker, M.W., Feil, S.C.** 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 88, 91–142.
- Rajamohan, F., Alzate, O., Cotrill, J.A., Curtiss, A., 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. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 93,14338–14343.
- Rausell, C., Muñoz-Garay, C., Miranda-CassoLuengo, R., Gómez, I., Rudiño-Piñera, E., Soberón, M., Bravo, A.** 2004a. Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of CryIAb toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane insertion intermediate. *Biochemistry* 43, 166–174.
- Rausell, C., García-Robles, I., Sánchez, J., Muñoz-Garay, C., Martínez-Ramírez, A.C., Real, M.D., Bravo, A.** 2004b. Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* [Say]. *Biochem. Biophys. Acta* 1660, 99–105.
- Schwartz, J.L., Lu, Y.J., Sohnlein, P., Brousseau, R., Laprade, R., Masson, L., Adang, M.J.** 1997. Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. *FEBS Lett.* 412, 270–276.
- Soberón, M., Bravo, A.** 2001. *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. Microbios en línea. <http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/index.html>. Fecha de consulta: 14-06-07.
- Soberón, M., Pardo-López, L., López, I., Gómez, I., Tabashnik, B., Bravo, A.** 2007. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science*. 318, 1640–1642.
- Tabashnik, B.E.** 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.*39, 47-79.
- Tabashnik, B.E., Gassmann, A.J., Crowder, D.W., Carriere, Y.** 2008. Insect resistance to *Bt* crops: evidence versus theory. *Nature Biotechnology*. 26, 199-202.

- Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, I., Ji, T.H., Bulla Jr., L.A.** 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270, 5490–5494.
- Valaitis, A.P., Jenkins, J.L., Lee, M.K., Dean, D.H., Garner, K.J.** 2001. Isolation and partial characterization of Gipsy moth BTR-270 an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. *Arch. Ins. Biochem. Physiol.* 46, 186–200.
- Wirth, M.C., Georghiou, G.P., Federici, B.A.** 1997. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 10536–10540.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Taussig, R., Bulla Jr., L.A.** 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 9897-9902.
- Zhuang, M., Oltean, D.I., Gómez, I., Pullikuth, A.K., Soberón, M., Bravo, A., Gill, S.S.** 2002. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J. Biol. Chem.* 277, 13863–13872.