



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

---

---

**Análisis de unión de toxinas Cry1A silvestres y modificadas en larvas  
resistentes y sensibles a toxinas Cry de *Pectinophora gossypiella* y  
*Plutella xylostella***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

**RAQUEL GABRIELA ARROYO LORANCA**

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARÍA ALEJANDRA BRAVO DE LA PARRA

2009





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **Datos del jurado**

### 1. Datos del alumno

Arroyo

Loranca

Raquel Gabriela

56 06 69 15

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

303501505

### 2. Datos del tutor

Dra

Bravo

De la Parra

María Alejandra

### 3. Datos del sinodal 1

Dra

Ramos

Morales

Patricia

### 4. Datos del sinodal 2

Dr

Soberón

Chávez

Mario

5. Datos del sinodal 3

Dra  
Rodríguez  
Almazán  
Claudia

6. Datos del sinodal 4

Dra  
Martínez  
Anaya  
Claudia

7. Datos del trabajo escrito.

Análisis de unión de toxinas Cry1A silvestres y modificadas en larvas resistentes y sensibles a toxinas Cry de *Pectinophora gossypiella* y *Plutella xylostella*

54 p.

2010

## **Agradecimientos**

En primera instancia quiero agradecer a la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, pues fue ella quien me dio la oportunidad de concluir esta etapa tan importante de mi vida.

A mi familia, quien siempre me apoyó a pesar de todas las dificultades que se presentaron, en ella encontré siempre el apoyo necesario cuando lo necesité.

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM, ya que en esta institución fue donde realicé mi tesis de licenciatura.

A la Dra. Alejandra Bravo y Dr. Mario Soberón, quienes me abrieron las puertas al mundo de la investigación científica. Además de brindarme siempre un punto de vista crítico y enriquecedor. Platicar con ellos de mi investigación era lo mejor que podía hacer, los admiro mucho.

A Jorge, gracias por enseñarme todo lo que necesité para realizar los experimentos, me enseñaste mucho.

A la Dra. Liliana, Dra. Claudia M., Dra. Claudia R., M en C Ángeles, por brindarme sabios consejos a la hora de los experimentos y también fuera del laboratorio, les agradezco todos los buenos momentos.

A Cynthia, Luis Enrique, Josué, Francisco y Emiliano, sin ustedes las cosas no hubieran sido iguales, gracias por todo chicos.

A mis compañeros del laboratorio, la convivencia fue muy buena y el ambiente académico siempre fue de colaboración mutua, gracias a todos por ayudarme a crecer.

## Tabla de contenido

Datos del jurado.....	2
Agradecimientos.....	4
Abreviaturas .....	7
Resumen .....	8
<b>1. Introducción .....</b>	<b>10</b>
1.1 Control de plagas.....	10
1.2 Estructura de las toxinas Cry producidas por <i>B. thuringiensis</i> .....	11
1.3 Modelos del mecanismo de acción de toxinas Cry1A .....	13
1.4 Receptores .....	15
1.5 Resistencia de insectos hacia toxinas Cry .....	16
1.6 Mecanismos de Resistencia.....	19
<b>2. Antecedentes .....</b>	<b>20</b>
2.1 Obtención de colonias de insectos resistentes a toxinas Cry. ....	20
2.1.1 Pectinophora gossypiella resistente a Cry1Ac (AZP-R).....	20
2.1.2 Plutella xylostella resistente a Toxinas Cry1As (NO-QA) .....	20
2.2 Análisis de la unión de toxinas Cry1A en la línea resistente de insectos de <i>P. gossypiella</i> (AZP-R). ....	22
2.3 Análisis de la unión de toxinas Cry1A en la línea resistente de insectos de <i>Plutella xylostella</i> (NO-QA) .....	22
2.4 Toxinas modificadas para matar insectos resistentes.....	25
<b>3. Planteamiento del problema .....</b>	<b>26</b>
<b>4. Hipótesis .....</b>	<b>26</b>
<b>5. Justificación .....</b>	<b>26</b>
<b>6. Objetivo general .....</b>	<b>26</b>
<b>6.1 Objetivos particulares .....</b>	<b>26</b>
<b>7. Materiales y Métodos.....</b>	<b>27</b>
7.1 Cepas y medios de cultivo.....	27
7.1.1 Cepas utilizadas en este trabajo.....	27
7.1.2 Medios de cultivo utilizados.....	27
7.2 Purificación y propagación de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac silvestre y modificadas. ....	28
7.3 Solubilización de cristales de Cry1Ab y Cry1Ac silvestres y modificadas.....	29
7.4 Proteólisis de Cry1Ab y Cry1Ac silvestres y modificadas.....	29
7.5 Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford.....	29
7.6 Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). ....	30
7.7 Western Blot.....	30
7.7.1 Western Blot $\alpha$ -APN y $\alpha$ -caderina .....	30
7.8 Extracción de vesículas de la vellosidad de la membrana apical (VMMA).....	31
7.9 Determinación de la concentración de proteínas de membrana por el método de Lowry.....	32
7.10 Ensayos de unión con la protoxina y toxina de Cry1Ab y Cry 1Ac silvestres y modificadas en <i>P. gossypiella</i> y <i>P. xylostella</i> sensibles y resistentes.....	32

7.11 Ensayos de unión con las toxinas de Cry1Ab y Cry1Ac silvestres y modificadas marcada con biotina en <i>P. gossypiella</i> y <i>P. xylostella</i> sensibles y resistentes.....	33
7.12 Ensayos de inmunoprecipitación para buscar nuevos receptores de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac silvestres y modificadas en <i>P. xylostella</i> sensible. ....	34
<b>8. Resultados .....</b>	<b>35</b>
8.1 Presencia de los receptores caderina y APN en <i>P. xylostella</i> y <i>P. gossypiella</i> .....	35
8.2 Solubilización y activación de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac silvestres y modificadas	37
8.3 Ensayo de unión de la toxina Cry1Ab y Cry1Ac silvestres y modificadas a VMMA de <i>P.</i> <i>xylostella</i> y <i>P. gossypiella</i> .....	38
8.4 Marcaje del oligómero de Cry1AbMod con biotina y tratamiento con urea 4M.....	38
8.5 Ensayo de unión con el oligómero de Cry1AbMod en <i>P. xylostella</i> .....	39
8.6 Ensayo de unión de la protoxina Cry1Ab silvestre y modificada a VMMA de <i>P.</i> <i>xylostella</i> .....	40
8.7 Ensayos de inmunoprecipitación para buscar nuevos receptores de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac silvestres y modificadas en <i>P. xylostella</i> sensible (LAP-B) y resistente (NO-QA) .....	41
<b>9. Discusión.....</b>	<b>43</b>
<b>10. Conclusiones .....</b>	<b>45</b>
<b>11. Perspectivas .....</b>	<b>45</b>
<b>12. Referencias .....</b>	<b>46</b>

## Abreviaturas

**$\alpha$ -APN:** anticuerpo anti APN

**$\alpha$ -caderina:** anticuerpo anti caderina

**$\alpha$ -Cry1A:** anticuerpo anti Cry1A

**ALP:** Alcalinofosfatasa

**APN:** Aminopeptidasa

**AZP-R:** línea resistente de *P. gossypiella*

**cAMP:** Adenosín Monofosfato cíclico

**Cry3D:** toxinas Cry de tres dominios

**GPI:** Glicosilfosfatidil inositol

**LAB-P:** línea sensible de *P. xylostella*

**NO-QA:** línea resistente de *P. xylostella*

**VMMA:** Vesículas de la membrana del epitelio del intestino medio



## Resumen

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram positiva. Posee propiedades entomopatógenicas. Produce inclusiones cristalinas que cuando son ingeridas por algún insecto éste muere debido a que la proteína ingerida actúa como una toxina formadora de poro en la membrana de la célula intestinal. Esto ocasiona un desbalance osmótico que mata a la célula y eventualmente a la larva.

Existen diversas plagas de cultivos de importancia económica, entre las que se encuentran *Plutella xylostella* y *Pectinophora gossypiella*; ambos lepidópteros son plagas en campos de coliflor y algodón respectivamente. En el caso de *P. xylostella* se han generado poblaciones resistentes a la toxina Cry1Ac en el campo, mientras que en el caso de *P. gossypiella* se aisló una colonia resistente a las toxinas Cry1As a través de cruzar individuos sensibles provenientes de campo de algodón. Se sabe que *P. gossypiella* posee mutaciones en el gen de caderina que es el primer receptor en el mecanismo de acción de las toxinas Cry-3D, mientras que se desconoce el mecanismo de resistencia de *P. xylostella*, ya que se ha visto que tanto el gen de caderina como los de otros receptores se encuentran intactos.

Recientemente se propuso que cuando la toxina se une a la caderina se induce un cambio conformacional en la toxina que permite el corte proteolítico del extremo amino terminal incluyendo la hélice  $\alpha$ -1, esto provoca la formación de un oligómero que se inserta en la membrana formando un poro en la célula del intestino larvario. Más tarde se demostró que toxinas Cry a las que se les eliminó la hélice  $\alpha$ -1 (llamadas Cry1AMod), no requieren de la unión al primer receptor para matar a las larvas y son capaces de matar a insectos resistentes como *P. xylostella* y *P. gossypiella*.

En este trabajo se analizó la presencia del receptor caderina en las colonias sensibles y resistentes de los dos insectos, además de la unión de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac silvestres y modificadas a las vesículas de la membrana del epitelio del intestino medio (VMMA) de estos lepidópteros. Nuestros datos mostraron que la población resistente de *P. gossypiella* carece de la caderina mientras que la población resistente de *P. xylostella* sí tiene una proteína tipo caderina. Los ensayos de unión de toxinas Cry1A y Cry1AMod monoméricas a las VMMA mostraron que no existe diferencia en la unión de estas toxinas a las membranas de las poblaciones sensibles y resistentes de los dos insectos. Finalmente, ensayos de unión con las protoxinas de Cry1Ab y Cry1Ac, silvestres y modificadas a las VMMA mostraron que las protoxinas Cry1Ab y Cry1Ac son capaces de formar un oligómero de 250 kDa sólo en las membranas de los insectos sensibles

mientras que las protoxinas Cry1AbMod y Cry1AcMod forman la estructura oligomérica en las membranas de los insectos sensibles y también en las membranas de los insectos resistentes.

Estos datos muestran que el mecanismo de resistencia en los dos insectos se debe a la falta de un receptor que facilita la oligomerización de las toxinas Cry1A siendo en el caso de *P. gossypiella* la caderina. Falta identificar el receptor responsable de la oligomerización de las toxinas Cry1A en *P. xylostella*.

## 1. Introducción

### 1.1 Control de plagas

A lo largo de la historia, el ser humano se ha tenido la necesidad de desarrollar diversas alternativas para combatir las plagas tanto virales como bacterianas, fúngicas o de animales existentes en sus cultivos.

Actualmente existe una gran gama de plaguicidas tales como fungicidas, alguicidas e insecticidas, siendo la mayoría de origen químico. Estos productos además de ser dañinos para el ambiente también lo son para el humano, debido a que son sustancias nocivas para la salud. En la agricultura, los insecticidas químicos se han utilizado durante muchas décadas. Sin embargo, algunos insecticidas son tan tóxicos que también dañan a la planta reduciendo las cosechas. Por otro lado, puede darse el caso de que el insecto se vuelva resistente a dicho químico y siga destruyendo los campos de sembrado. Esto ocurrió de manera masiva en la década de 1940, ya que en esa época se descubrieron muchas sustancias capaces de acabar con las plagas, por lo que los productos derivados de ellas se usaron de manera descontrolada, generando en los insectos una resistencia masiva a dichos productos químicos. Además, estas sustancias químicas son altamente nocivas para todos los seres vivos y no son biodegradables [CEPA, 2003]. Por estas razones, se han tratado de desarrollar nuevas tecnologías que le permitan al humano el control de diversas plagas sin la necesidad del uso de pesticidas químicos.

El control de plagas sobre distintos cultivos es de gran importancia económica y social, puesto que la producción de éstos alimenta a una gran parte de la población mundial, lo que genera un bienestar social. Económicamente hablando, la pérdida de cultivos de forma masiva por la presencia de plagas puede ser muy grande, afectando así la economía mundial, ya que se estima que la pérdida neta de cultivos que no utilizan alguna clase de insecticidas puede ser hasta del 20% [FAO, 2001]. Una alternativa al uso de insecticidas químicos son los bioinsecticidas, que son aquellos productos tóxicos para las plagas producidos por otro organismo biológico, por ejemplo, virus, toxinas bacterianas y de hongos para matar algunos insectos, ya que tienen actividad entomopatogénica. La utilización de estos productos ha aumentado debido a su gran eficacia. Un caso particular es el de *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*), que al ser una bacteria entomopatogénica altamente específica, inocua para los vertebrados y para el medio ambiente, es el perfecto bioinsecticida para el control de plagas en diversos cultivos como el maíz y el algodón [Pardo-López *et al*, 2009]. Este bioinsecticida tiene varias presentaciones, desde polvos y aerosoles hasta plantas transgénicas. Las toxinas que produce *B. thuringiensis* son la mejor

alternativa ante los productos químicos y por ende, la más utilizada comercialmente. Se estima que en el mercado de los bioinsecticidas, abarca más del 80% de las ventas, siendo el número uno a nivel mundial [Schnepf *et al.*, 1998].

Los organismos transgénicos son organismos a los que se les ha introducido uno o más genes provenientes de otro individuo de una especie diferente. En el caso de las plantas transgénicas Bt, se introduce el gen de la toxina Cry dentro del genoma de la planta. De esta manera, la planta expresa la proteína insecticida de forma endógena y es capaz de matar a los insectos que la afectan sin la necesidad de la aplicación externa de plaguicidas [de Maagd *et al.*, 1999].

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram positiva considerada como entomopatogénica debido a que produce proteínas que son capaces de matar a insectos blanco. Estas proteínas son conocidas como  $\delta$ -endotoxinas Cry y Cyt y son originadas durante la fase de esporulación de esta bacteria. Las toxinas se encuentran contenidas en inclusiones cristalinas dentro del compartimiento de la célula madre [Soberón *et al.*, 2009].

## 1.2 Estructura de las toxinas Cry producidas por *B. thuringiensis*

Existen diferentes tipos de toxinas Cry producidas por Bt, entre las que se encuentran las toxinas Cry de tres dominios (Cry-3D), las tipo Cry-Mtx y las tipo Cry-Bin; estos tres tipos de toxinas Cry no comparten identidad de secuencia, y es muy probable que sus mecanismos de acción sean distintos [Soberón, 2009]. Las toxinas tipo Cry-Mtx y las tipo Cry-Bin tienen algunos rasgos similares con las toxinas Mtx y Bin producidas por *B. sphaericus*, aunque en el caso de *B. thuringiensis* son tóxicas para coleópteros y no para mosquitos como lo son en *B. sphaericus* [de Maagd *et al.*, 2003].

Las proteínas Cry-3D son por mucho, las más estudiadas. Como lo indica su nombre, poseen tres dominios estructurales, donde el dominio I está compuesto por siete  $\alpha$ -hélices. La hélice central  $\alpha$ -5 se encuentra rodeada por seis hélices externas completamente anfipáticas (Figura 1) [Li, *et al.*, 1991]. Este dominio ha sido relacionado con la formación de poro, ya que muestra similitudes con otras toxinas formadoras de poro como la colicina Ia y N y la toxina de difteria [de Maagd *et al.*, 2003]. Además, mutaciones en este dominio reducen tanto la formación de poro como la toxicidad [Jiménez *et al.*, 2007, Rodríguez-Almazán *et al.*, 2009]. El dominio II se compone por tres hojas- $\beta$  antiparalelas que forman un prisma- $\beta$  (Figura 1). Este dominio juega un papel importante, debido a que interactúa con los receptores de las toxinas [Jenkins, Dean, 2000].

Las mutaciones dirigidas en este dominio pueden aumentar o disminuir la afinidad de la toxina hacia las membranas de células de insectos blanco. Al hacer esta mutaciones se ha logrado producir toxinas más activas o inactivas que se correlacionan directamente con el cambio de afinidad de las mismas. Estos datos indican que el dominio II es muy importante tanto para la unión a receptores como para la toxicidad [Schnepf *et al.*, 1998]. El dominio III es un sándwich- $\beta$  formado por dos hojas- $\beta$  antiparalelas (Figura 1). Este dominio se encuentra involucrado en la interacción con segundos receptores que son proteínas ancladas a la membrana por lípidos del tipo glicosilfosafatidil inositol (GPI), tales como la aminopeptidasa (APN) y la alcalino fosfatasa (ALP) [de Maagd *et al.*, 2003]. Existen algunos datos que muestran, que el hacer un intercambio de dominios III, puede resultar en cambios en la especificidad de la toxina, lo cual indica que este dominio es de vital importancia para la especificidad de la toxina [Schnepf *et al.*, 1998].

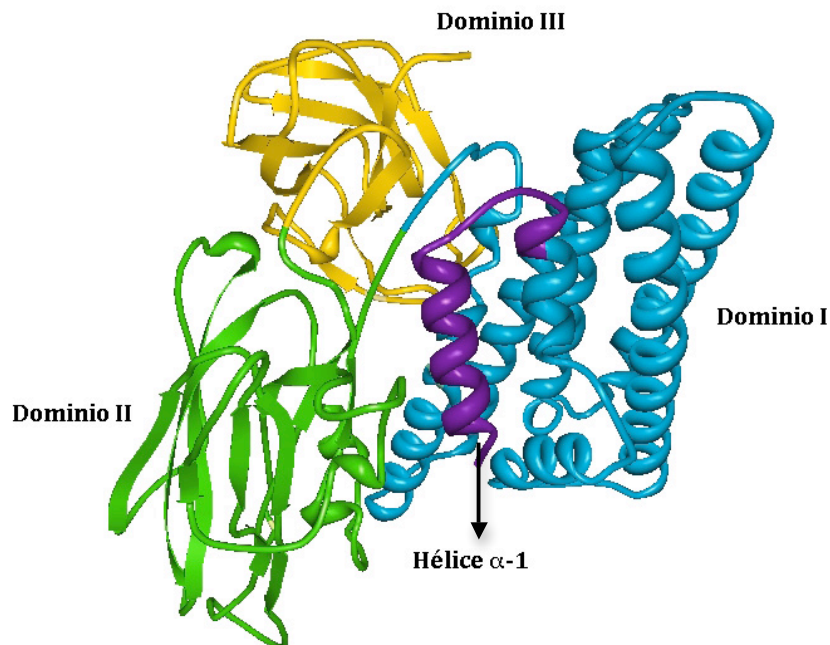


Figura 1.- Modelo de la estructura tridimensional de la proteína Cry1Ab a partir de la estructura cristalográfica de la toxina Cry1Aa. El dominio I se muestra en color azul, el dominio II en verde y el dominio III en amarillo; en color morado se muestra la hélice  $\alpha$ -1. La figura fue hecha con Protein Workshop.

Todas las toxinas Cry-3D se expresan como protoxinas durante la fase de esporulación de la bacteria. Algunas protoxinas tienen un tamaño de 70 kDa y otras de 130 kDa [Soberón *et al.*, 2009]. La protoxina de 70 kDa es proteolizada sólo en el extremo N-terminal, formando una toxina de 60 kDa. En cambio, las protoxinas de 130 kDa son procesadas del extremo N-terminal

como las de 70 kDa, pero también del C-terminal dejándolas también de un tamaño final de 60 kDa [Grochulski *et al.*, 1995]. Todas las toxinas de tres dominios poseen regiones conservadas que corresponden a regiones internas en el dominio I y el dominio III y a regiones de contacto entre el dominio I con el dominio II o del dominio II con el dominio III. Hasta el momento se ha reportado la estructura de seis toxinas Cry-3D y todas presentan una estructura muy similar, por lo que se propone que todas las toxinas Cry-3D tienen mecanismos de acción semejantes, así como estructuras tridimensionales similares [Soberón *et al.*, 2009].

### 1.3 Modelos del mecanismo de acción de toxinas Cry1A

Hasta el momento se han descrito dos modelos que explican el posible mecanismo de acción para las toxinas Cry-3D: el modelo de formación de poro [Bravo *et al.*, 2004] y el modelo de transducción de señales [Zhang, 2006].

Los dos modelos comparten los primeros pasos en el modo de acción donde las protoxinas de Cry-3D, al ser ingeridas por la larva se solubilizan en el lumen del intestino debido a las condiciones del medio (altamente reductor y pH alcalino). Una vez que se llevó a cabo la solubilización, las proteínas son proteolizadas tanto en el extremo amino, y en su caso, también en el carboxilo por proteasas del intestino generando un monómero activo de la toxina (60 kDa) [Grochulski *et al.*, 1995]. Estas toxinas se unen a un primer receptor, el cual está localizado en las células del intestino medio. En el caso de diferentes insectos lepidópteros sensibles a las toxinas Cry1As, se ha demostrado que proteínas tipo caderina son las que actúan como un primer receptor [Gómez *et al.*, 2001 y 2003, Vadlamudi *et al.*, 1993, Xie *et al.*, 2005]. Recientemente en el mosquito *Anopheles gambiae*, se descubrió una caderina que funciona como receptor de la toxina Cry4Ba [Hua *et al.*, 2008] y Cry11Ba [Abdullah *et al.*, 2006], y en el coleóptero *Tenebrio molitor* también se descubrió una caderina como receptor de la toxina Cry3A.

En el modelo propuesto por Bravo *et al.*, una vez que la toxina se une a la caderina, se facilita un corte proteolítico extra en el amino terminal de la toxina, en donde se elimina la hélice  $\alpha$ -1 del dominio I (Figura 1) [Gómez *et al.*, 2002 y Jiménez *et al.*, 2007]. Este corte expone regiones que antes estaban ocultas, lo cual induce la formación de un oligómero de toxina que se propone podría estar formado de tres o cuatro subunidades debido a su peso molecular de 250 kDa. Se ha reportado que el oligómero de Cry1Ab incrementa su afinidad por el segundo receptor casi 200 veces, por lo que al ser más afines a éste se anclan a él. En este caso, los segundos receptores son proteínas ancladas a la membrana a través de un puente de glicosilfosfatidil

inositol (GPI). Estos receptores se localizan en microdominios de la membrana denominadas balsas lipídicas (en inglés *lipid rafts*) que están involucradas en la señalización intracelular, así como en el tráfico de membranas (endocitosis y exocitosis). Estas regiones han sido reportadas como el sitio de entrada de diferentes toxinas como ántrax, aerolisina, entre otras [Zhuang *et al.*, 2002 y Chen *et al.*, 2005]. Finalmente, una vez que el oligómero se une a su receptor secundario, se inserta en los microdominios de la membrana (*lipid-rafts*) formando poros en la membrana apical del intestino de la larva, provocando así un choque osmótico y causando la muerte de la célula [Bravo *et al.*, 2004]. La aminopeptidasa (APN) o la alcalino fosfatasa (ALP) son segundos receptores que han sido descritos en lepidópteros como *Manduca sexta* y *Heliothis virescens* [Jurat-Fuentes *et al.*, 2004 y Bravo *et al.*, 2004]. En el caso de organismos del orden Diptera se han reportado una ALP en *Aedes aegypti* [Fernández *et al.*, 2006] y una APN para *Anopheles quadrimaculatus* [Abdullah *et al.*, 2006]. En el caso del orden Coleoptera (*Leptonotarsa decemlineata*) se ha reportado una metaloproteasa ADAM, que funciona como receptor de la toxina Cry3A [Ochoa *et al.*, 2007].

El modelo de transducción de señales propuesto por el Dr. Bulla en 2006, sugiere que la toxicidad de las proteínas Cry se debe a que desencadenan una cascada de señalización dependiente de  $Mg^{2+}$  que es activada únicamente por la interacción de la toxina monomérica con su primer receptor, la caderina. Dicha interacción activa proteínas G, que a su vez activan a la adenilciclase. Esto incrementa los niveles intracelulares de cAMP, que a su vez activan a la proteínkinasa A. Esta última proteína enciende una ruta de muerte celular no apoptótica, la cual todavía no ha sido dilucidada del todo. Sin embargo, el grupo del Dr. Bulla propone que es una muerte por oncosis [Zhang *et al.*, 2006]. Es importante mencionar que este modelo fue descrito mediante experimentos desarrollados en líneas celulares de insecto y no en larvas de insecto, es decir, no fue realizado *in vivo* como el modelo anterior.

La principal diferencia entre los dos modelos es que en uno se predice la formación de una estructura oligomérica capaz de insertarse en la membrana de las células del intestino medio (formación de poro) y en el otro no (transducción de señales). Además, la función que desempeña la caderina es diferente, ya que a pesar de que en ambos modelos se propone que es el primer receptor, la función que desempeña es muy diferente, siendo en un modelo inductora de cambios conformacionales que es la base para promover un corte proteolítico y por ende un cambio en la estructura de la toxina de monómero a oligómero; y en el otro modelo, es el factor desencadenante para una cascada de segundos mensajeros. Sin embargo, al final, ambos modelos coinciden en la muerte celular.

Como se menciona anteriormente, a la fecha se han reportado distintos receptores, tales como la caderina, APN, alcalino fosfatasa y metaloproteasas, para toxinas Cry en diversos insectos, de los cuales los más estudiados han sido la caderina y la APN.

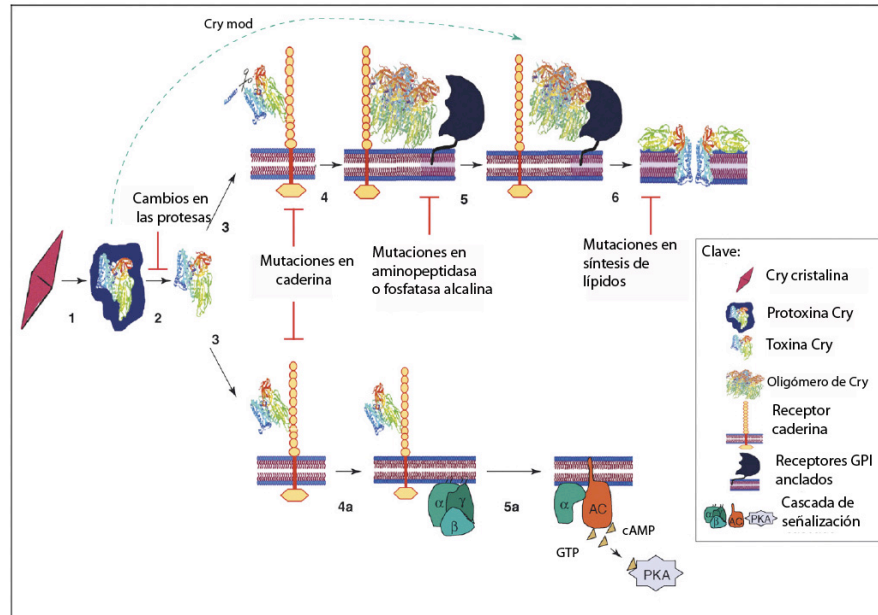


Figura 2.- Propuesta de los dos modelos, donde en el paso 1 corresponde a la solubilización del cristal, el paso 2 señala cortes mediante proteasas del intestino medio y el 3 es la unión al primer receptor. Los pasos 4-6 representan el modelo de Bravo, mientras que los pasos 4a-5a representan el modelo de Bulla. La flecha azul de línea punteada indica el mecanismo de las toxinas Cry modificadas, que al carecer de la hélice  $\alpha$ -1, forman directamente el oligómero uniéndose al segundo receptor sin necesidad de pasar por el primer receptor. Imagen modificada de Bravo, 2008 *Trends in Biotechnology*.

## 1.4 Receptores

Las caderinas son proteínas transmembranales de 220 kDa con un dominio citoplásmico, un dominio transmembranal y un ectodominio extracelular con varias repeticiones de caderina (12 en el caso de *M. sexta*) [Dorsch *et al.*, 2002 y Vadlamudi *et al.*, 1995]. El ectodominio posee sitios de unión a calcio, sitios de interacción con integrinas y secuencias de unión a caderina. Esta proteína posee un papel muy importante con la interacción del dominio II de las toxinas Cry funcionando así como un primer receptor [Schnepf *et al.*, 1998 y Bravo *et al.*, 2004], ya que une al monómero de la toxina con gran afinidad (Kd 1nM) [Pigott, Ellar, 2007]. Hasta el momento se han identificado tres sitios en el ectodominio extracelular de la caderina, CR7, CR11 y CR12, que interaccionan con diferentes sitios de la toxina Cry1A: CR7 con el asa 2, CR11 con el asa  $\alpha$ -8 y



CR12 con el asa 3, todos del dominio II [Dorsch *et al.*, 2002, Gómez *et al.*, 2003, Jenkins, Dean 2000 y Nagamatsu *et al.*, 1999, Gómez *et al.*, 2006, Pacheco *et al.*, 2009].

Por otro lado, la APN juega un papel importante como receptor secundario, ya que induce que la toxina en forma oligomérica se inserte en la membrana para formar el poro [Masson *et al.*, 1995]. La afinidad del monómero por APN es baja (Kd 100 nM), pero la del oligómero es muy grande (Kd de 0.75 nM) [Bravo *et al.*, 2004]. Este receptor tiene un tamaño de 120 kDa y contiene glicosilaciones como N-acetil-galactosamina [Yaoiet *et al.*, 1997] que es reconocida por el dominio III de la toxina Cry1Ac [Masson *et al.*, 1995, Cooper *et al.*, 1998, Burton *et al.*, 1999]. Así mismo, diversos estudios han indicado que la región  $\beta$ 16 y  $\beta$ 22 del dominio III de Cry1Aa y Cry1Ab, está involucrada en el reconocimiento de la APN [Bravo *et al.*, 2004, Nakanishi *et al.*, 2002 y Atsumi *et al.*, 2005, Gómez *et al.*, 2006].

### 1.5 Resistencia de insectos hacia toxinas Cry

El riesgo más importante del uso de toxinas Cry es la posibilidad de que los insectos desarrollen resistencia a las plantas Bt. Desde 1997 se han utilizado comercialmente las plantas de maíz-Bt y algodón-Bt y se predijo que aproximadamente tres años después, podrían comenzar a aparecer insectos resistentes en el campo. Sin embargo, sólo hasta el 2008 (11 años después), se reportó el primer evento de resistencia a plantas Bt en campo, el cual fue totalmente controlado con el uso de insecticidas químicos [Tabashnik, 2008].

La resistencia de los insectos a las toxinas Bt ha sido ampliamente estudiada bajo condiciones de laboratorio y se ha visto que es un carácter recesivo, por lo que aún puede ser controlada de manera efectiva mediante el uso de un método de cultivo conocido como refugio y con plantas que expresen la más alta concentración de proteína. Este método se basa en que el 80-95% del cultivo sea transgénico y exprese una alta dosis de proteína, mientras que el 5-20% restante sea silvestre y se acomode en las orillas del cultivo transgénico para que de esta manera, los insectos resistentes que aparezcan en la región de plantas Bt se puedan cruzar con insectos sensibles de la región de refugio y se generen así organismos heterocigotos sensibles a la toxina [McGaugheg *et al.*, 1998]. Esta estrategia ha sido muy efectiva para atrasar el desarrollo de organismos resistentes homocigotos. El uso de refugios explica por qué no se han generado poblaciones de insectos resistentes a plantas Bt en los últimos diez años. Debido a que ya comienzan a aparecer insectos resistentes en cultivos de algodón transgénico en EUA [Tabashnik, 2008], se debe comenzar a proponer nuevas alternativas y estrategias para controlar la aparición

de los insectos resistentes a las toxinas Bt, ya que estos datos indican que en un futuro la resistencia de los insectos ante las plantas Bt transgénicas va a predominar aún con el uso de los refugios.

Por otro lado, existe la preocupación de que el mal manejo de cultivos transgénicos pueda llegar a terminar con la diversidad biológica de algunas especies. Tal es el caso del maíz en México, por lo que en el 2005, se publicó en el Diario Oficial de la Federación la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) una ley que regula todas las actividades relacionadas con los Organismos Vivos Modificados (OMV), con el fin de prevenir, evitar y/o reducir los posibles riesgos que estas actividades pudieran ocasionar al medio, al hombre y a la biodiversidad en general [Barrios *et al.*, 2006]. En el caso de las toxinas producidas por *B. thuringiensis* se descarta que provoquen daños al hombre, al medio ambiente o a otros animales. Estudios realizados indican que las toxinas producidas por *B. thuringiensis* no son tóxicas hacia otros organismos ni generan alergias de ningún tipo en humanos [Mendelson *et al.*, 2003].

Estudios en laboratorio han permitido aislar poblaciones de insectos resistentes a toxinas Cry y en algunos casos se ha demostrado que los insectos resistentes a las toxinas Cry presentan generalmente mutaciones en el gen de la caderina (Tabla 1).

Nombre científico	Nombre común	Principales cultivos afectados *	Resistencia a toxinas Cry	Mecanismo de resistencia	Referencias
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Gusano nemátodo	-	Cry5B	Defectos en síntesis de lípidos	Griffitts, 2001 y 2005
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Mosquito	-	Cry4A, Cry4B y Cry11Aa	Desconocido	Georghiou, 1997
<i>Diatraea saccharalis</i>	Gusano barrenador de la caña de azúcar	Maíz, azúcar y sorgo	Cry1Ab	Desconocido, recesivo	Huang, 2007
<i>Ephestia kuehniella</i>	Polilla de la harina	Harinas almacenadas	Tolerancia a Cry1A y Cry2A	Tolerancia debida a sobreproducción de lipoforina	Rahman, 2004 y Mahbubur, 2007
<i>Helicoverpa armigera</i>	Gusano cogollero	Algodón, frijol, maíz y sorgo	Cry1Ac	Falta del receptor caderina. Sobreproducción de esterasas y hexamerina	Xu, 2005; Gunning, 2005 y Ma, 2005
<i>Helicoverpa zea</i>	Gusano del maíz	Maíz, algodón, tabaco y jitomate	Cry1Ac	Desconocido	Anilkumar, 2008
<i>Heliothis virescens</i>	Gusano de los brotes del tabaco	Algodón, maíz y jitomate	Cry1Ac, Cry2Aa	Falta de receptores como caderina y alcalino fosfatasa. Defectos en proteasas	Gahan, 2001; Jurat-Fuentes, 2006, 2003, 2004 y Forcada, 1996
<i>Pectinophora gossypiella</i>	Gusano rosado del algodón	Algodón	Cry1Ac, Cry1Ab	Ausencia del receptor caderina	Morin, 2003
<i>Plodia interpunctella</i>	Palomilla india de la harina	Harinas y nueces	Subespecie Bt entomocidus	Defectos en proteasas del intestino medio	Oppert, 1997
<i>Plutella xylostella</i>	Palomilla dorso de diamante o del repollo	Brassicaceae	Cry1Ac, Cry1Ab	Desconocido, recesivo	Baxter, 2005 y Baxter, 2008
<i>Spodoptera exigua</i>	Rosquilla verde o gardama	Arroz, azúcar, algodón y jitomate	Cry1C	Falta de aminopeptidasa 1	Herrero, 2005
<i>Trichoplusia ni</i>	Gusano falso	Brassicaceae	Cry1Ac	Desconocido, recesivo	Janmaat, 2003

Tabla 1.- Descripción de algunas plagas de insectos y nemátodos resistentes a las toxinas Cry. \* significa que no hubo efecto en cultivos [Bravo, 2008].

Actualmente en campo, sólo se han presentado tres casos de resistencia a las toxinas Cry. *Plutella xylostella* [Tabashnik *et al.*, 1990] y *Trichoplusia ni* [Janmaat, Myers, 2003] se hicieron resistentes a aerosoles que contienen toxinas Bt, mientras que *Helicoverpa armigera* [Xu *et al.*, 2005; Gunning *et al.*, 2005 y Ma *et al.*, 2005, Tabashnik, 2008] se volvió resistente a plantas Bt. La resistencia se ha podido estudiar mediante el aislamiento de colonias resistentes a las toxinas Cry en condiciones de laboratorio. Un ejemplo es el de *Pectinophora gossypiella*, donde el Dr. Tabashnik aisló insectos heterocigotos del campo y los cruzó en el laboratorio [Tabashnik *et al.*, 2000]; de esta manera se seleccionaron insectos homocigotos resistentes al algodón Bt, lo que indica que ya existen alelos de resistencia en campo y por ende se puede predecir que la resistencia al algodón Bt en campo, se podría presentar en un futuro cercano.

## 1.6 Mecanismos de Resistencia

Existen distintos mecanismos de resistencia a las toxinas Cry, todos ellos involucrados con la afectación de algún paso en el mecanismo de acción (Tabla 1). Por ejemplo, defectos en la solubilización y activación de las protoxinas debido a una disminución o a un exceso de proteasas en el intestino como en los insectos *Plodia interpunctella* [Oppert *et al.*, 1997] y *Heliothis virescens* [Forcada *et al.*, 1999]. Defectos en la expresión de la APN como en *Spodoptera exigua* [Herrero, 2005] y *Spodoptera litura* [Herrero *et al.*, 2005]. Mutaciones en el gen de caderina, como es el caso de *Heliothis virescens* [Gahan *et al.*, 2001], *P. gossypiella* [Morin *et al.*, 2003] y *Helicoverpa armigera* [Xue *et al.*, 2005]. Finalmente, también se ha generado resistencia debida a una elevación de la respuesta inmune como en *Ephestia kuehniella* [Rahman *et al.*, 2004 y 2007], debido a que genera en los insectos una mayor tolerancia a las toxinas Cry.

El mecanismo de resistencia más común se ha denominado modo 1, donde se tienen diferentes niveles de co-resistencia a las toxinas Cry1A, Cry1F y Cry1J (ya que tienen el dominio II muy semejante estructuralmente), es una resistencia de carácter recesivo y presenta poca resistencia a las toxinas Cry1C [Tabashnik, 1994]. Entre los insectos con resistencia modo 1 se encuentran *P. gossypiella*, *P. xylostella*, *Trichoplusia ni*, *Helicoverpa armigera* y *Heliothis virescens*. En tres de estos insectos (*P. gossypiella*, *Helicoverpa armigera* y *Heliothis virescens*) se ha correlacionado la resistencia modo 1 con la presencia de mutaciones en el gen de la caderina (Tabla 1). En el caso de *P. xylostella* se ha visto que no está relacionada con mutaciones el gen de la caderina, ya que este gen fue mapeado y se encuentra en un cromosoma distinto de donde se encuentra el gen que le confiere resistencia [Baxter *et al.*, 2008]. Finalmente, en el caso de *T. ni* no se han hecho estudios que permitan establecer si la resistencia está ligada a mutaciones en el gen de caderina.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Obtención de colonias de insectos resistentes a toxinas Cry.

#### *2.1.1 Pectinophora gossypiella resistente a Cry1Ac (AZP-R)*

La obtención de la colonia de insectos resistentes de *P. gossypiella* se llevó a cabo por el grupo del Dr. Bruce Tabashnik en Arizona EUA. Colectaron ejemplares del campo y realizaron una selección de poblaciones resistentes al alimentarlos con toxina Cry1Ac. Primero los sometieron a una dieta en el laboratorio que contenía 10 µg/ml, 3.2 µg/ml ó 1 µg/ml de la toxina Cry1Ac. De estos bioensayos sobrevivieron 159 individuos que fueron los progenitores de la cepa AZP-R. De la F<sub>1</sub>-F<sub>4</sub>, se dejaron crecer en dieta normal, es decir, sin toxina. En la segunda ronda de selección, aproximadamente 100,000 larvas de la F<sub>5</sub> fueron expuestas a 10 µg/ml de toxina y se pudo notar que su LC<sub>50</sub> aumentó de 0.53 µg/ml a 162 µg/ml de Cry1Ac, indicando una resistencia de 300 veces. Posteriormente se hizo una tercera selección con las larvas de la F<sub>7</sub>, exponiéndolas a 100 µg/ml de Cry1Ac, obteniendo así la cepa final llamada AZP-R que es 3,000 veces más resistente que la original [Tabashnik *et al.*, 2000]. Más tarde, se mapearon los alelos relacionados o asociados con la resistencia a las toxinas Bt, y se encontraron tres alelos, todos afectando el gen de caderina [Morin *et al.*, 2003]. Estas mutaciones en el gen de caderina le confieren co-resistencia a diferentes toxinas Cry1A, como la Cry1Ab.

#### *2.1.2 Plutella xylostella resistente a Toxinas Cry1As (NO-QA)*

La colonia resistente NO-QA de *P. xylostella*, también fue obtenida por el grupo del Dr. Bruce Tabashnik. Se colectaron aproximadamente 80 ejemplares de campo provenientes de una granja de la ciudad de Pearl en Oahu, Hawaii, donde Bt había sido usada exhaustivamente en forma de aerosoles por 8 años. La F<sub>1</sub> fue sometida a una dieta de hojas de col tratadas con Dipel<sup>1</sup> a concentraciones de 0.256, 2.56 y 256 µg de ingrediente activo/ml (IA/ml). Se obtuvo una LC<sub>50</sub> de 63.9 µg IA/ml, 25 veces más alta que la LC<sub>50</sub> de la línea susceptible LAB-P [Tabashnik *et al.*, 1990]. Esta cepa fue criada durante tres generaciones sin ser expuesta a la toxina, y después se dividió

---

<sup>1</sup> Formulación múltiple de toxinas de la subespecie de Bt *kurstaki*, que contiene cinco toxinas Cry: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A, and Cry2B, esporas e ingredientes de la formulación [Abbott Laboratories, 1992].

en cuatro colonias: NO-P, NO-Q, NO-R y NO-U. La colonia NO-Q fue seleccionada para una mayor resistencia, mientras que la NO-U fue escogida para estudiar la resistencia moderada. Aproximadamente 200 larvas de la colonia NO-Q fueron sometidas a una dieta de hojas de col tratadas con Dipel 25.6–512 µg de IA/ml. Se crió a la descendencia sobreviviente sin exponerla a la toxina hasta el segundo estadio de vida y se seleccionaron individuos resistentes, obteniendo una media de 116 adultos. Esta colonia se dividió en dos: NO-QA y NO-QB a partir del tratamiento con Dipel tras el decaimiento de la resistencia debido a que la colonia NO-Q dejó de ser sometida a la toxina durante 14 y 16 generaciones respectivamente. Se seleccionaron individuos de la NO-QA durante 3 generaciones (en la F<sub>2</sub> se expusieron 80 individuos a Dipel, de los cuales ninguno murió) y de la NO-QB durante 5 generaciones. Finalmente la colonia NO-QA continuó la selección de resistencia hasta obtener una colonia que es 3000 veces más resistente que la cepa inicial sensible llamada LAB-P [Tabashnik *et al*, 1994].

La cepa NO-QA de *P. xylostella* posee un gen autosómico recesivo que le confiere resistencia al menos a cuatro toxinas Bt: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Fa [Tabashnik *et al*, 1997], y que no se encuentra involucrado con el gen de caderina ni con el de APN, ya que el gen o genes que confieren resistencia están ligados a un cromosoma distinto de donde se encuentran los genes de estos receptores [Baxter *et al*, 2008].

Recientemente, en 2008, se hizo un estudio para tratar de identificar a los genes que confieren resistencia a la colonia NO-QA de *P. xylostella*, y lo que se demostró es que no están involucrados aquellos genes que codifican para la APN, la ALP, la glicoproteína P252, o la mucina intestinal. Indicando así, que la mutación o mutaciones que le confieren resistencia a las toxinas Cry a este lepidóptero se encuentran en un cromosoma distinto [Baxter *et al*, 2008]. Este insecto presenta resistencia tipo modo I, pero que no está ligada a mutaciones en el gen de la caderina. También se ha sugerido que esta población presenta mutaciones en otro gen que se encargue de realizar modificaciones post-traduccionales a la proteína de caderina y debido a esta modificación se afecte la unión de la toxina a dicha proteína y por esto presente fenotipo de resistencia modo I similar al observado en los insectos donde la resistencia está asociada al gen de caderina como en *H. virescens* y *P. gossypiella*.

## 2.2 Análisis de la unión de toxinas Cry1A en la línea resistente de insectos de *P. gossypiella* (AZP-R).

Existe sólo un estudio acerca de la unión de las toxinas Cry en *P. gossypiella* AZP-R, en el que se compara la unión de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac en insectos sensibles y resistentes. Estas toxinas se marcaron radioactivamente con  $^{125}\text{I}$ , y se analizó su unión a Vesículas de la Microvellosidad de la Membrana Apical (VMMA) del intestino de este lepidóptero. Se realizaron experimentos de competencia homóloga y heteróloga con diferentes toxinas no marcadas (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Ja y Cry2Aa). Los resultados indican que la unión de Cry1Ac en la línea AZP-R está ligeramente afectada, ya que presenta constantes de disociación  $K_d$  de 4.2 nM, cuando esta toxina presenta una  $K_d$  de 1.0 nM en la unión con la línea sensible. Por el contrario, la toxina Cry1Ab está severamente afectada, tanto que no se puede calcular la afinidad porque no presenta unión a las membranas de la línea AZP-R, a diferencia de la línea sensible que presenta una  $K_d$  de 0.5 nM. Por otro lado, los experimentos de competencia heteróloga permitieron concluir que en la línea sensible las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Ja, comparten un mismo sitio de unión. El hecho de que la toxina Cry1Ab no se une a las VMMA del insecto *P. gossypiella* AZP-R, permite decir que esta línea presenta una resistencia del tipo Modo 1, es decir, co-resistencia a diferentes toxinas Cy1As y que afecta la unión de al menos una de ellas [González-Cabrera *et al.*, 2003].

## 2.3 Análisis de la unión de toxinas Cry1A en la línea resistente de insectos de *Plutella xylostella* (NO-QA)

Existen varios estudios que se enfocan en el análisis de la unión de toxinas Cry1As a VMMA de insectos *P. xylostella* resistentes (NO-QA) y sensibles (LAP-B) de *P. xylostella*. Algunos de estos trabajos presentan datos contradictorios, sobretodo en cuanto a la unión de Cry1Ac a VMMA de estos insectos. Estas diferencias podrían deberse a que utilizan sistemas de análisis distintos.

En 1994, el grupo del Dr. Tabashnik realizó un ensayo de unión de toxina Cry1Ac marcada con  $\text{I}^{125}$  a VMMA para analizar la reversión de la resistencia en insectos pertenecientes a la cepa resistente NO-QA a dicha toxina. Ellos vieron que la línea NO-QA no une a la toxina Cry1Ac. Sin embargo, cuando a esta línea es criada durante 13 generaciones sin ser expuesta a la toxina, la

resistencia desaparece, volviéndose tan sensible como la cepa LAP-B; esto correlaciona directamente con el reestablecimiento de la unión a la toxina Cry1Ac [Tabashnik *et al.*, 1994].

En otro trabajo publicado en 1995, se muestra el análisis de la unión de la toxina Cry1Ac a las líneas NO-QA y LAP-B de *P. xylostella*. Este trabajo presenta datos contradictorios al anterior, ya que aunque la unión de Cry1Ac es muy semejante en las dos poblaciones de insectos (NO-QA y LAP-B), reportaron una afinidad de 7.1 nM en la línea LAP-B y de 8.9 en la NO-QA. En este trabajo analizaron la unión de la toxina Cry1Ac por medio de una técnica llamada “Surface Plasmon Resonance (SPR)” realizados en un aparato llamado Biacore, que mide las interacciones entre proteínas en tiempo real. Encontraron que no existen diferencias en la unión de Cry1Ac en las dos poblaciones. Por lo que concluyen que existen otros factores además de la unión al receptor que están siendo afectados en las larvas resistentes a la toxina [Masson *et al.*, 1995]. Desafortunadamente, no trabajaron con otras toxinas como la Cry1Ab.

Posteriormente, otro grupo analizó si la resistencia estaba ligada con cambios en la unión de la toxina Cry1Ac marcada con I<sup>125</sup> al segundo receptor: la APN, por lo que purificaron esta proteína de VMMA de *P. xylostella* (NO-QA y LAP-B), realizaron ensayos de unión de ligando (ligand blot), donde concluyen que la unión de Cry1Ac a la APN no se encuentra afectada en la línea NO-QA [Luo *et al.*, 1997]. Cabe mencionar que en estos experimentos los receptores se encuentran desnaturalizados ya que se analizan en geles SDS-PAGE, a diferencia de los datos anteriores en donde la proteína receptora está en conformación nativa.

Existen otras poblaciones de *P. xylostella* resistentes a la toxina Cry1Ac que han sido seleccionadas en otras regiones del mundo. Se ha visto que las poblaciones resistentes de Pennsylvania y de Hawaii comparten un locus asociado con la unión disminuida de toxinas Cry1Ac, lo que les confiere una gran resistencia a cuatro toxinas Bt (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1F). Por el contrario, la población resistente de Filipinas es muy diferente a las otras dos, ya que la resistencia está asociada a varios locus, no es recesiva y tampoco presenta una disminución en la unión de otras toxinas Bt, sólo de Cry1Ab. [Tabashnik *et al.*, 1997].

En un estudio comparativo, donde analizan la unión de diferentes toxinas Cry1A y Cry1F marcadas con I<sup>125</sup> y diferentes poblaciones de *P. xylostella* sensible (LAP-B) y tres líneas resistentes diferentes (Hawaii, Pennsylvania y Filipinas), proponen un modelo que indica que Cry1Aa tiene dos sitios de unión, de los cuales uno está compartido con las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1F. La población de Filipinas está afectada sólo en la unión de Cry1Ab, y las de Hawaii y Pensilvania están afectadas en el segundo sitio, afectando así la unión de Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1F (Figura 3). También concluyen que la reducción de la unión de las toxinas en *P.*



*xylostella* no explica por completo la resistencia en estos insectos y por ende no es el único mecanismo de resistencia en este insecto [Ballester *et al.*, 1999].

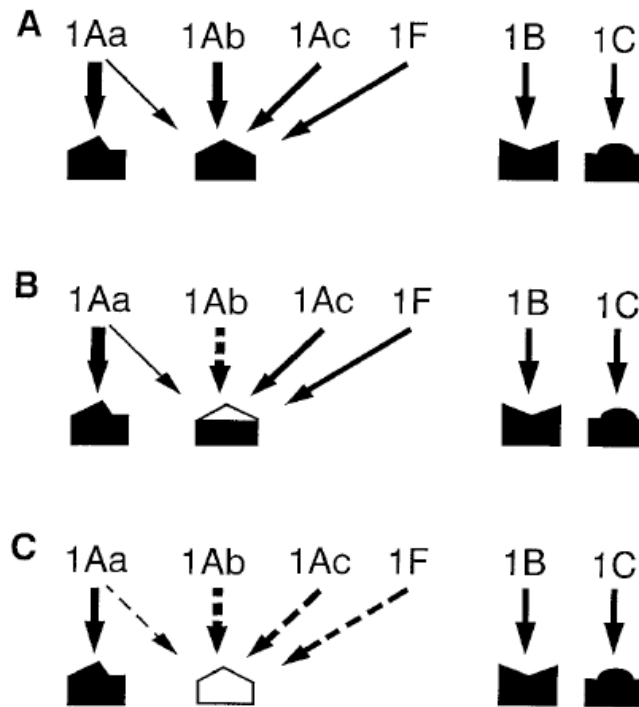


Figura 3.- Modelo propuesto para la unión de las toxinas de Bt a los sitios de unión en VMMA de *P. xylostella* en insectos sensibles (A), en la línea resistente de Filipinas (B), y en las líneas NO-QA y Pennsylvania (C). Las flechas más anchas indican unión con gran afinidad. Las flechas punteadas indican que no hay unión o que ésta es muy reducida. Las flechas promedio indican simplemente unión [Ballester, 1999].

Finalmente, existe otra población de *P. xylostella* resistente a Cry1Ac, aisladas de Maruyama Japón. Esta colonia es muy diferente a las mencionadas anteriormente, ya que la colonia resistente es sensible a Cry1Ab, por lo que no se parece a la NO-QA. Se realizaron ensayos de unión de toxinas Cry1As a VMMA de las colonias resistente y sensible y se concluyó que en ambas colonias la toxina Cry1Ac se une de igual manera. También vieron que la unión de la Cry1Ac a VMMA se inhibe sólo en presencia de anticuerpo anti-caderina, pero no por anticuerpo anti-APN [Higuchi *et al.*, 2007].

Todos estos trabajos permiten concluir que la interacción de Cry1Ac con las membranas del intestino de insectos resistentes no es el proceso por el cual se observa la resistencia. Cabe mencionar que todos estos estudios fueron realizados con toxinas activadas con tripsina en forma de monómero. En ningún trabajo se ha tenido el interés de analizar la unión de la protoxina ni del oligómero de las toxinas Cry a las VMMA.

## 2.4 Toxinas modificadas para matar insectos resistentes.

El grupo de la Dra. Alejandra Bravo y del Dr. Mario Soberón del Instituto de Biotecnología de la UNAM desarrolló unas toxinas Cry-3D modificadas (Cry1AbMod y Cry1AcMod) [Soberón *et al.*, 2007]. Estas toxinas presentan una delección de 58 aminoácidos en el extremo amino terminal incluyendo la hélice  $\alpha$ -1 y representan una alternativa para combatir insectos resistentes a las toxinas Cry silvestres, ya que al carecer de la hélice  $\alpha$ -1, son capaces oligomerizar en ausencia del primer receptor (caderina) e interaccionar con el segundo receptor, insertándose en la membrana celular para llevar a cabo la formación de poro. Son altamente efectivas contra todos aquellos insectos que han desarrollado resistencia del modo tipo I [Tabashnik *et al.*, 1994]. Además, el oligómero que se forma activando la toxina con tripsina es completamente funcional y su actividad es muy semejante a la del oligómero de la toxina silvestre [Soberón *et al.*, 2007]. Estas toxinas modificadas son capaces de matar a los insectos resistentes de *P. xylostella* NO-QA y *P. gossypiella* AZP-R. También son capaces de matar a larvas de *Manduca sexta* que carecen de caderina por silenciamiento de esta proteína mediante RNA de interferencia (RNAi). Para esto se sintetizaron RNAs de doble cadena del gen de caderina y se inyectaron a larvas del primer estadio. Como resultado, las larvas perdieron la expresión de la caderina, esto fue detectado mediante un análisis tipo Western blot. Dichas larvas, al perder la caderina se volvieron resistentes a la toxina Cry1Ab, sin embargo, la toxina Cry1Ab modificada fue capaz de matarlas, mostrando así que es efectiva en el control de estas larvas silenciadas de caderina (Muñoz-Garay *et al.*, 2009).

En el presente trabajo se trabajó con *P. gossypiella* resistente (AZP-R) y sensible, así como con *P. xylostella* resistente (NO-QA) y sensible y con las toxinas Cry1As silvestres (Cry1Ab y Cry1Ac) y Cry1As modificadas (Cry1AbMod y Cry1AcMod). Recordemos que la resistencia a Cry1Ac de *P. gossypiella* AZP-R está ligada al gen de caderina y que en el caso de *P. xylostella* NO-QA no es así y que todavía no se conoce cuál es el gen afectado en este insecto.

### **3. Planteamiento del problema**

¿Cuál es el mecanismo de evasión que tienen los insectos *P. xylostella* y *P. gossypiella* resistentes a las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac a nivel de los receptores para evitar la muerte por la ingesta de éstas?

### **4. Hipótesis**

La resistencia de *P. xylostella* se debe a que posee un receptor distinto de caderina y de aminopeptidasa, que no se encuentra presente en la línea resistente pero sí en la línea sensible, permitiéndole evadir el mecanismo de acción de las toxinas Cry1As.

La resistencia de *P. gossypiella* es ocasionada por la falta del primer receptor: caderina.

### **5. Justificación**

Se trabajó con *P. xylostella* y *P. gossypiella* debido a que ambos son insectos que presentan resistencia de tipo Modo I, sin embargo están asociadas a causas distintas, ya que en *P. xylostella* se desconoce la razón de la resistencia, mientras que en *P. gossypiella* se sabe que la resistencia está ligada directamente al gen de caderina, por lo que se quiere deducir cuáles son las diferencias y similitudes presentadas entre estos insectos en cuanto a la resistencia de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac se refiere.

### **6. Objetivo general**

Caracterizar el mecanismo mediante el cual las toxinas modificadas matan a los insectos resistentes

#### **6.1 Objetivos particulares**

-Analizar la unión de las toxinas Cry1Ab silvestre y modificada y Cry1Ac silvestre y modificada en *P. xylostella* NO-QA y LAP-B, y en *P. gossypiella* AZP-R y sensible utilizando las diferentes formas de la proteína, es decir, en su forma de toxina, protoxina y oligómero.

-Identificar la presencia o ausencia de los receptores APN y caderina.

## 7. Materiales y Métodos

### 7.1 Cepas y medios de cultivo.

#### *7.1.1 Cepas utilizadas en este trabajo.*

- Cry1Ab silvestre: Bt-407 + plásmido pHT315 donde está clonado el gen de Cy1Ab
- Cry1Ab modificada: Bt-407 + plásmido pHT315 donde está clonado el gen de Cry1AbMod
- Cry1Ac silvestre: HD-73
- Cry1Ac modificada: Bt-407 + plásmido pHT315 donde está el gen de Cry1AcMod

#### *7.1.2 Medios de cultivo utilizados.*

##### *LB (Luria-Bertani)*

Bacto-peptona	10 g
Bacto-extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Bacto-agar	15 g

Aforar a 1 L con agua destilada y ajustar el pH a 7 con NaOH, agregar el agar al final. Esterilizar durante 20 minutos a 15 lb/sq. Una vez esterilizado, dejar enfriar un poco y agregar eritromicina 10 µg/ml. Colocar el medio en cajas de cultivo y dejar secar el medio.

##### *HCT*

Bacto-triptona	2.5 g
Casaminoácidos	1 g
Bacto-agar	7.5 g

Aforar a 446 ml con agua destilada, ajustar el pH a 7.25 con KOH y agregar el agar hasta el final. Esterilizar durante 20 minutos a 15 lb/sq. Una vez esterilizado, dejar enfriar un poco y agregar las siguientes soluciones previamente esterilizadas:

Solución I	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.8 g	Disolver en 100 ml de agua destilada. Esterilizar Agregar 25 ml
Solución II	MgSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1.23 g	Disolver en 100ml de agua destilada. Esterilizar Agregar 0.5 ml
	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.0169 g	
	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.14 g	
Solución III	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2 g	Disolver en 100 ml de agua destilada. Esterilizar Agregar 5 ml
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1N	10 ml	
Solución IV	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	1.47 g	Disolver en 100 ml de agua destilada. Esterilizar Agregar 5 ml

Glucosa a 10% Agregar 15 ml de una solución esterilizada

Eritromicina 10 µg/ml.

### 7.2 Purificación y propagación de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac silvestre y modificadas.

Se tomó una asada del glicerol de cada una de las cepas y se crecieron en cajas de LB eritromicina (10 µg/ml) por 12 h a 30° C. Se re-estriaron en medio HCT sólido y se incubaron a 30° C durante 48 h aproximadamente hasta alcanzar la fase de esporulación, verificando esta etapa mediante un microscopio óptico. De cada cepa se crecieron 20 cajas.

Se raspó todo el contenido bacteriano de todas las cajas, procurando poner el contenido de cada 10 cajas de la misma cepa en 30 ml de una solución 0.3M de NaCl y 0.01 M de EDTA pH 8. Se centrifugó cada tubo obtenido durante 10 min a 10 000 rpm. La pastilla obtenida se resuspendió en 30 ml de la misma solución, el sobrenadante fue descartado y se volvió a centrifugar 10 min a 10 000 rpm. Los lavados se repitieron dos veces más. La pastilla obtenida fue resuspendida en 30

ml de H<sub>2</sub>O con PMSF 1mM y se centrifugó como se describe anteriormente. Este lavado se repitió 2 veces más. La pastilla final obtenida fue resuspendida en H<sub>2</sub>O con PMSF 1mM de acuerdo al tamaño de ésta, dejando así las muestras en forma de espора- cristal. Se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford y se analizaron en un gel SDS-PAGE.

### 7.3 Solubilización de cristales de Cry1Ab y Cry1Ac silvestres y modificadas.

Se tomaron 500 µl de las muestras de espора- cristal de cada cepa y se centrifugaron 10 min a 10 000 rpm. La pastilla obtenida se resuspendió en buffer carbonatos pH 10.5 con β-mercaptoetanol 0.2%, se incubaron por 10 min a 37° C con agitación (650 rpm). Se centrifugaron las muestras 10 min a 10 000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Se cuantificó la proteína por Bradford y se corrió un gel SDS-PAGE al 10% para verificar la presencia de la protoxina (130 kDa).

### 7.4 Proteólisis de Cry1Ab y Cry1Ac silvestres y modificadas.

A 200 µl de protoxina soluble se le agregó tripsina (1:50, tripsina:proteína), se incubaron las muestras 2 h a 37° C con agitación (650 rpm). La reacción fue detenida con PMSF 1 mM y se centrifugó 10 min a 10 000 rpm. El sobrenadante se recuperó y se cuantificó la proteína por Bradford (Biorad). Se corrió la electroforesis en gel SDS-PAGE al 10% para ver verificar el producto de la proteólisis (65 kDa) y se tiñendo con azul de Coomassie (Biorad).

### 7.5 Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford.

Se colocaron 795 µl de agua destilada y 5 µl de muestra en un tubo. Se agitó para homogeneizar la muestra y se le agregaron 200 µl de reactivo de Bradford de Biorad. Posteriormente se hizo la lectura de la proteína en un espectrofotómetro (Pharmacia LKB UltraspecII), midiendo a 595 nm de absorbancia. El valor obtenido de absorbancia fue extrapolado en una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) que abarca un rango de concentraciones de 1 a 20 µg/ml, para así obtener el valor de la concentración de proteína. Para el

blanco se colocaron 800  $\mu$ l de agua destilada en un tubo y 200  $\mu$ l de reactivo de Bradford de Biorad.

#### 7.6 Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Se utilizó la electroforesis de geles desnaturalizantes de proteína para el análisis de protoxina y toxina. Para este propósito se prepararon geles al 8% y 10% de acrilamida tal como describe Laemmli *et al.*, 1970. Estos geles fueron teñidos con azul de Coomassie (Biorad).

#### 7.7 Western Blot.

Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham Biosciences) durante 1 hora a 350 mA en una cámara húmeda con amortiguador de transferencia (Tris base 3%, Glicina 14.4% y etanol al 20%). La membrana fue lavada con PBS y posteriormente bloqueada con PBS-Tween 2% durante 20 min con agitación. Después se lavó 10 min con PBS-Tween 0.1% dos veces y se incubó con el primer anticuerpo ( $\alpha$ -Cry1Ab o  $\alpha$ -Cry1Ac) en una relación 1:30 000 en PBS-Tween 0.1% en agitación durante 1 hora. Se lavó la membrana dos veces con PBS-Tween 0.1% por 10 min cada lavado y se agregó el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidada (1:10 000) incubando por 1 hora con agitación. Finalmente la membrana se lavó dos veces con PBS-Tween 0.1% por 5 min y una vez con PBS por 10 min. Se agregaron los reactivos de quimioluminiscencia (Pierce) y se reveló la señal.

##### *7.7.1 Western Blot $\alpha$ -APN y $\alpha$ -caderina*

Para el Western Blot  $\alpha$ -APN se descongelaron las VMMA de *P. xylostella* y *P. gossypiella* sensibles y resistentes, se tomaron 20  $\mu$ l de cada una y se colocaron en tubos separados y previamente etiquetados, se centrifugaron 10 min a 14 000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las pastillas obtenidas en 20  $\mu$ l de PBS 1X+CaCl<sub>2</sub> 5mM.

Se corrieron estas muestras en un gel SDS-PAGE al 10%; posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham Biosciences) durante 1 hora a 350 mA

en una cámara húmeda. La membrana fue lavada con PBS 1X durante 10 min y se bloqueó con PBS-Tween 2% por 30 min con agitación. Se lavó la membrana dos veces por 15 min con PBS-Tween 0.1% y se agregó el primer anticuerpo ( $\alpha$ -APN de *M. sexta*) en una relación 1:30 000 en PBS-Tween 0.1% incubando por 1 hora con agitación. Se lavó la membrana dos veces con PBS-Tween 0.1% durante 15 min cada lavado y se agregó el anticuerpo secundario (anti-conejo IgG (molécula completa)-Peroxidasa, desarrollado en cabra, Sigma) en una relación 1:10 000 dejando incubarse durante 1 hora con agitación. Finalmente, se lavó la membrana dos veces con PBS-Tween 0.1% por 15 min y un lavado final de 10 min con PBS 1X. Se agregaron los reactivos de quimioluminiscencia (Pierce) y se reveló la señal.

Para el Western  $\alpha$ -caderina las muestras se prepararon de igual manera, la diferencia radicó que en lugar de utilizar como primer anticuerpo  $\alpha$ -APN, se utilizó  $\alpha$ -caderina de *H. virescens* para *P. xylostella* y dos anticuerpos que fueron levantados en conejo utilizando dos fragmentos de la caderina de *P. gossypiella* ( $\alpha$ -CR8-CR9 (anticuerpo 229) y  $\alpha$ -CR8-CR11 (anticuerpo 230)) [Morin *et al*, 2003].

#### 7.8 Extracción de vesículas de la vellosidad de la membrana apical (VMMA).

Se extrajeron intestinos de larvas de *P. xylostella* resistentes (1.13g) y sensibles (0.97g). Para esto se retardó el metabolismo de las larvas colocándolas en hielo durante 15 min aproximadamente. Posteriormente se disectó cada larva realizando cortes transversales en la parte cefálica y caudal, se le retiró el intestino jalándolo por uno de los extremos, se lavó en amortiguador de disección y fue colocado en un tubo Ependorff con amortiguador de disección. Después, los intestinos obtenidos fueron pesados, y colocados en un tubo de vidrio estéril, se les agregó un volumen 1:10 (peso:volumen) de solución I fría (4° C). Con un émbolo estéril colocado previamente en un taladro Black & Decker U114 tipo FV, se le dieron 9 golpes a una velocidad de 2 250 rpm, es decir, el émbolo se hundió poco a poco en el tubo de cristal hasta llegar al fondo y se sacó lentamente. Se agregó un volumen igual de solución II fría (4° C) en el tubo de cristal, se tapó y se invirtió suavemente. La muestra se incubó en hielo durante 15 min y se centrifugó a 4 500 rpm a 4° C por 15 min, recuperando el sobrenadante, que fue centrifugado nuevamente pero a 16 000 rpm a 4° C por 30 min. La pastilla obtenida se recuperó en ½ de volumen de solución I fría y ½ volumen de solución II fría. Estos lavados se repitieron una vez más, recuperando la pastilla en solución I con CaCl<sub>2</sub> 5 mM en una proporción 1:1 de solución I y agua desionizada de acuerdo al tamaño de la pastilla obtenida. La muestra obtenida se alicuotó y se guardó a -70° C. Se apartó una



alícuota de cada cepa (sensible y resistente) para cuantificar proteínas de membrana por el método de Lowry.

Solución I		Solución II	
Manitol	300 mM	MgCl <sub>2</sub>	24 mM
Tis-HCl	17 mM		
DTT	2 mM	Amortiguador de disección	
CaCl <sub>2</sub>	1 mM	Manitol	300 mM
Ajustar pH a 7.4 con KOH		Tris-HCl	17 mM
		EGTA	5 mM
		DTT	2 mM
		PMSF	1mM

Los intestinos de las larvas de *P. gossypiella* resistentes y sensibles fueron proporcionados por el grupo del Dr. Tabashnik.

#### 7.9 Determinación de la concentración de proteínas de membrana por el método de Lowry.

Para determinar la concentración de proteínas de membrana se empleó un kit de Biorad (Dc Protein Assay). Se preparó la solución I poniendo 1 ml de solución A y 20 µl de solución S. Se colocaron 5 µl de la muestra en los tubos y se agregaron 125 µl de solución I. Se agitaron y se dejaron incubar a temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente se agregó 1 ml de reactivo B, se agitó y se dejó a temperatura ambiente 15 minutos. Se leyó en el espectrofotómetro a 750 nm. Para el blanco se colocaron 125 µl de solución I y 1 ml de reactivo B.

Finalmente se calculó la concentración de proteína con base en una curva estándar de proteína que se realizó con albúmina de suero bovino (BSA) (0, 1, 2, 3 y 4 µg/µl).

#### 7.10 Ensayos de unión con la protoxina y toxina de Cry1Ab y Cry 1Ac silvestres y modificadas en *P. gossypiella* y *P. xylostella* sensibles y resistentes.

Se incubaron 10 µg de VMMA con las distintas protoxinas y toxinas a una concentración de 50 nM en amortiguador de unión (PBS-Tween 0.1% pH 9) en un volumen final de 100 µl durante

una hora a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras 10 min a 14 000 rpm, la pastilla obtenida se lavó con amortiguador de incubación dos veces y se recuperó en 15  $\mu$ l de PBS. Alternativamente se lavó una vez con amortiguador de incubación y se incubó en 100  $\mu$ l de amortiguador álcali frío por media hora en hielo, se centrifugaron las muestras como se menciona anteriormente y se lavaron una vez con amortiguador de incubación y también se recuperaron en 15  $\mu$ l de PBS. Finalmente se realizó una electroforesis en un gel SDS-PAGE al 8% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para visualizar la unión de las protoxinas y toxinas a las VMMA por medio de Western blot utilizando anticuerpo  $\alpha$ -Cry1Ab o  $\alpha$ -Cry1Ac respectivamente en una dilución 1:15 000 (PBS-Tween 0.1% : anticuerpo).

Amortiguador álcali

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM

Manitol 300 mM

#### 7.11 Ensayos de unión con las toxinas de Cry1Ab y Cry1Ac silvestres y modificadas marcada con biotina en *P. gossypiella* y *P. xylostella* sensibles y resistentes.

Se incubaron las toxinas (Cry1Ab silvestre y modificada y Cry1Ac silvestre y modificada) con biotina (20  $\mu$ l de biotina por cada 0.6 mg de proteína) durante una hora a temperatura ambiente, posteriormente se retiró la biotina no incorporada a través de una columna de Sephadex G-25 y recolectando la fracción que salió de ella, debido a que esa fracción contenía las proteínas marcadas y la biotina no incorporada se quedó en la columna. Se comprobó si las toxinas habían sido marcadas mediante la electroforesis de un gel SDA-PAGE al 8% y posterior transferencia a una membrana de nitrocelulosa y revelada con SAPO (estreptavidina acoplada a peroxidasa).

Se incubaron 10  $\mu$ g de VMMA con las distintas toxinas marcadas con biotina a una concentración de 10 nM en amortiguador de unión (PBS-Tween 0.1% pH 9) volumen final de 100  $\mu$ l durante una hora a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras 10 min a 14 000 rpm, la pastilla obtenida se lavó con amortiguador de incubación dos veces y se recuperó en 15  $\mu$ l de PBS. Finalmente se realizó una electroforesis en un gel SDS-PAGE al 8% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para visualizar la unión de las toxinas a las VMMA por medio de Western blot utilizando SAPO en una dilución 1:4 000 en PBS-Tween 0.1%.

### 7.12 Ensayos de inmunoprecipitación para buscar nuevos receptores de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac silvetres y modificadas en *P. xylostella* sensible.

Se lavaron 100  $\mu$ l de perlas (proteína A-Sepharosa C-4B) con PBS tres veces 10 min a 14 000 rpm a 4° C para retirarles el etanol en el que vienen, se retiró el sobrenadante. Posteriormente se incubaron con 2  $\mu$ l de anticuerpo  $\alpha$ -Cry1Ab o  $\alpha$ -Cry1Ac según el caso más 98  $\mu$ l de PBS 1X durante 1 hora a 4° C en agitación. Se lavaron tres veces las muestras con PBS 1X por 10 min a 14 000 rpm a 4° C. Se recuperó la pastilla y se guardó a 4° C hasta su posterior uso.

Se descongelaron las VMMA de *P. xylostella* y se tomaron 30  $\mu$ g por muestra. Se incubaron con protoxina 50 nM de Cry1Ab o Cry1Ac en amortiguador de incubación (PBS-Tween 0.1% pH 9) volumen final de 50  $\mu$ l a 37° C durante 1 hora en agitación. La reacción se detuvo con PMSF concentración final 1mM, se centrifugaron las muestras por 10 min a 14 000 rpm a 4° C y se lavaron tres veces con PBS. La pastilla obtenida en el tercer lavado fue solubilizada en 100  $\mu$ l de un amortiguador de solubilización (PBS 1X, CHAPS 60 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM y PMSF 1mM) durante 1 hora a 25° C en agitación. Después se centrifugaron 10 min a 14 000 rpm a 4° C y se recuperó el sobrenadante, esta operación se repitió una vez más. El sobrenadante obtenido se incubó con las perlas previamente unidas al anticuerpo correspondiente y guardadas a 4° C, durante 12 horas a 4° C en agitación. Pasadas las 12 horas, se centrifugaron 10 min a 14 000 rpm a 4° C y se lavaron 10 veces con PBS 1X, recuperando la pastilla obtenida, se les agregó mezcla lítica a una concentración final de 1X y se hirvieron durante 8 min. Finalmente se centrifugaron 10 min a 14 000 rpm a 4° C y se retiró el sobrenadante; éste se corrió en un gel SDS-PAGE al 10% y se realizó un Western blot y un Coomassie.

## 8. Resultados

### 8.1 Presencia de los receptores caderina y APN en *P. xylostella* y *P. gossypiella*

La primera parte consiste en comprobar la existencia o ausencia de los receptores en los insectos sensibles y resistentes de *P. xylostella* y de *P. gossypiella*, por lo que se hicieron Western blots  $\alpha$ -caderina utilizando un anticuerpo  $\alpha$ -caderina que fue purificado de conejo cuando se le inyectó caderina de *H. virescens*. Como se observa en la figura 4a, la caderina se encuentra presente en ambas líneas de *P. xylostella*, esta proteína presenta un peso aproximado de 250 kDa, la banda de 170 kDa y la de aproximadamente 130 kDa que aparecen en el Western blot pueden deberse a la degradación de la caderina tal como se ha reportado para otros insectos como *M. sexta* [Francis, Bulla, 1997] (Figura 4a).

El anticuerpo  $\alpha$ -caderina de *H. virescens* no reconoce ninguna proteína en *P. gossypiella* y tampoco el anticuerpo  $\alpha$ -caderina de *M. sexta*. Fue por esto que se utilizaron anticuerpos proporcionados por el grupo del doctor Tabashnik, quienes generaron anticuerpos contra fragmentos de caderina de *P. gossypiella* expresados en *E. coli*.

Se utilizaron 2 de estos anticuerpos ( $\alpha$ -CR8-CR9 (anticuerpo 229) y  $\alpha$ -CR8-CR11 (anticuerpo 230)) y con ellos se pudo observar que la línea sensible de *P. gossypiella* posee una caderina sin mucha degradación cuyo peso molecular aproximado es de 250 kDa, mientras que en la línea sensible no se presenta ninguna banda que indique la presencia de caderina, este resultado apoya la idea de que la falta de caderina es responsable de la resistencia a las toxinas Cry1As (figura 4b).

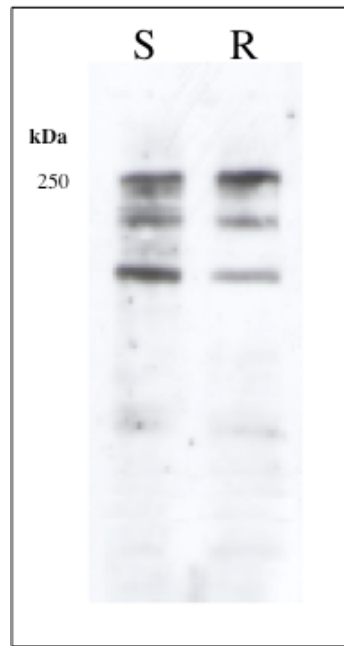


Figura 4a.- Western blot  $\alpha$ -caderina en VMMA de *P. xylostella* (LAB-P) sensible (S), y (NO-QA) resistente (R)...

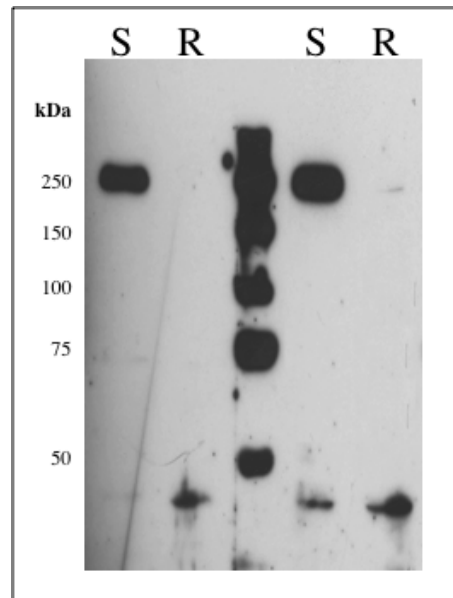


Figura 4b.- Western blot  $\alpha$ -caderina en VMMA de *P. gossypiella* (AZP-R) sensible (S) y resistente (R).

Posteriormente se llevaron a cabo Western blots con un anticuerpo  $\alpha$ -APN de *M. sexta* para ver la presencia de este receptor en las líneas de *P. xylostella* sensible y resistente. Se encontró que en ambas líneas existe una proteína de aproximadamente 100 kDa que corresponde con el peso esperado de la APN. Se realizó un experimento del mismo tipo para *P. gossypiella*, obteniendo los mismos resultados, ya que en ambas líneas (sensible y resistente) también se

encuentra presente una banda correspondiente a una APN de aproximadamente 100 kDa (Figura 4c).

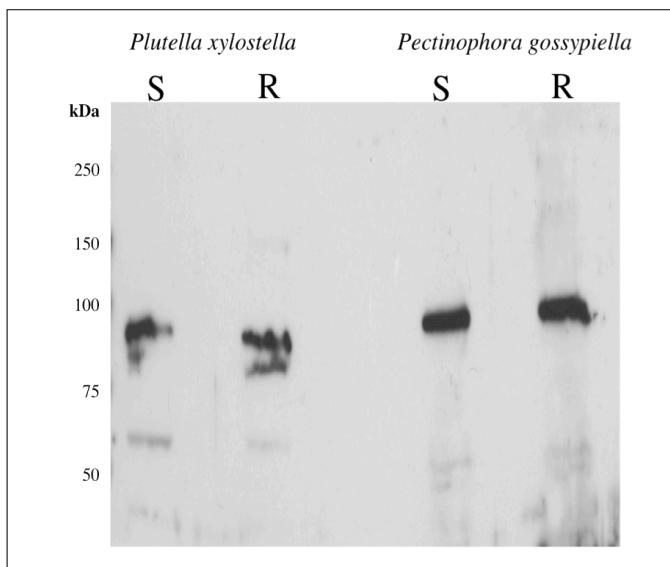


Figura 4c.- Western blot  $\alpha$ -APN en VMMA de *P. xylostella* (LAB-P) sensible (S) y (NO-QA) resistente (R) y en VMMA de *P. gossypiella* sensible (S) y (AZP-R) resistente (R).

## 8.2 Solubilización y activación de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac silvestres y modificadas

Posteriormente se usaron en ensayos de unión las protoxinas y toxinas de Cry1Ab silvestre y modificada así como de Cry1Ac silvestre y modificada. de 130 kDa las protoxinas y de 65 kDa las toxinas activadas con tripsina tal como se describe en materiales y métodos.

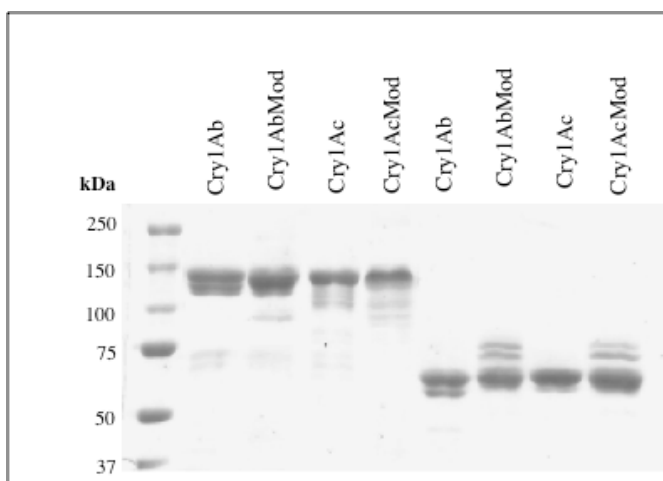


Figura 5.- Gel SDS-PAGE al 10% mostrando las protoxinas y toxinas respectivamente de las toxinas indicadas.

### 8.3 Ensayo de unión de la toxina Cry1Ab y Cry1Ac silvestres y modificadas a VMMA de *P. xylostella* y *P. gossypiella*

Se hicieron ensayos de unión de las toxinas activadas (65 kDa) Cry1Ab silvestre, Cry1AbMod, Cry1Ac silvestre y Cry1AcMod en forma de monómero a VMMA de *P. xylostella* de ambas líneas (LAB-P y NO-QA), al igual que a VMMA de *P. gossypiella* de ambas líneas (sensible y AZP-R). Se determinó que no existen diferencias en la unión de las toxinas en forma de monómero a las vesículas de estos insectos.

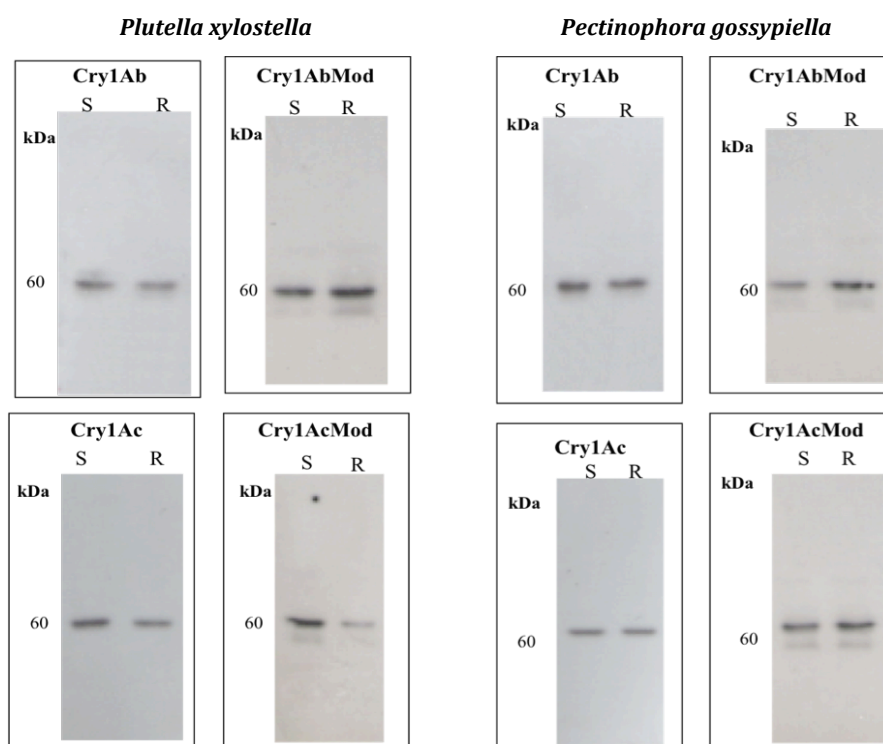


Figura 6.- Unión de las toxinas Cry1Ab, Cry1AbMod, Cry1Ac y Cry1AcMod a VMMA de *P. xylostella* LAB-P (S) y NO-QA (R) y *P. gossypiella* sensible (S) y AZP-R (R). Las toxinas unidas fueron detectadas con  $\alpha$ -Cry1Ab y  $\alpha$ -Cry1Ac, respectivamente.

### 8.4 Marcaje del oligómero de Cry1AbMod con biotina y tratamiento con urea 4M

En otro tipo de ensayos de unión la toxina Cry1AbMod en forma de monómero y oligómero se intentó marcar con biotina, técnica hasta ahora no reportada. Sin embargo, como se puede ver en la figura 6, el oligómero fue imposible de marcar, tal vez debido a que la biotina es

una vitamina de estructura voluminosa. Se sabe que en la estructura tridimensional del monómero existen dos lisinas en el dominio III que se encuentran expuestas al solvente. Sin embargo no se sabe cuál es la estructura tridimensional del oligómero, y podría ser que estas lisinas, antes expuestas en el monómero, se encuentren más ocultas, causando así que el marcaje sea poco eficiente. Entonces se intentó hacer un poco más laxa la estructura del oligómero sin afectarla de manera permanente, pero aún en presencia de urea 4M fue imposible marcarlo, solamente se pudo marcar el monómero. Fue por esto que se trabajó con anticuerpos para el revelado de las uniones, tal como se muestra en el experimento anterior.

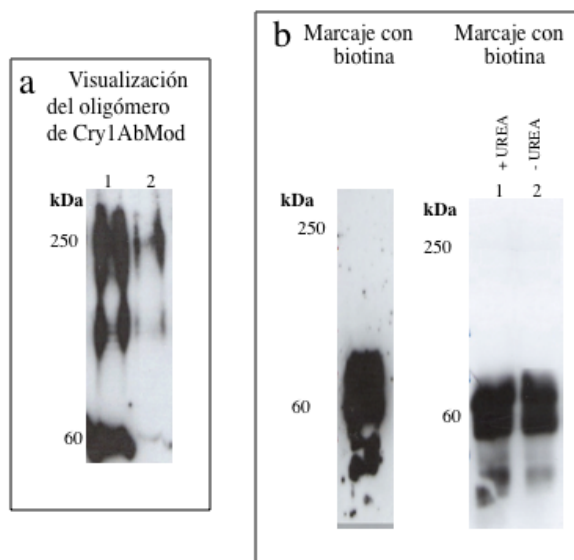


Figura 7.- Marcaje de Cry1AbMod con biotina. En la figura 6a se ve la proteína a marcar (Cry1AbMod, detectada con  $\alpha$ -Cry1Ab), la figura 6a 1 es una muestra con monómero y oligómero y 6a 2 es oligómero purificado. En la figura 6b (izquierda) se aprecia el marcaje con biotina de Cry1Ab. En la figura 6b 1 se observa el marcaje en presencia (+) y en la 6b 2 en ausencia (-) de urea 4M.

### 8.5 Ensayo de unión con el oligómero de Cry1AbMod en *P. xylostella*

Una vez que se determinó que el oligómero no puede ser marcado con biotina, se quiso analizar la unión del oligómero a las VMMA de las líneas de *P. xylostella* sensible (LAB-P) y resistente (NO-QA), utilizando la toxina Cry1AbMod. Con este experimento se pudo concluir que el oligómero es capaz de unirse a las VMMA de ambas líneas de este insecto, mostrando así que en forma de oligómero la toxina no hace distinción entre las líneas. Por lo tanto sugiere que la resistencia no está relacionada con la interacción del oligómero a las membranas (figura 7).



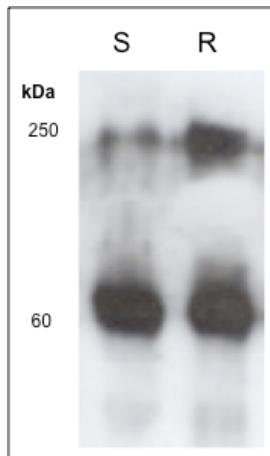


Figura 8.- Detección de la unión del oligómero de Cry1AbMod a VMMA de *P. xylostella* LAB-P (S) y NO-QA (R).

#### 8.6 Ensayo de unión de la protoxina Cry1Ab silvestre y modificada a VMMA de *P. xylostella*

Tras observar que la unión del oligómero y de la toxina activada no están afectadas en las larvas sensibles y resistentes de *P. xylostella*, se analizó la unión de la protoxina de Cry1Ab silvestre y Cry1AbMod a ambas líneas este lepidóptero (LAB-P y NO-QA). Con este experimento pudo observarse una diferencia en la unión de las protoxinas, ya que cuando la protoxina silvestre de Cry1Ab interactúa con las membranas de la línea sensible (LAB-P), se produce un oligómero que es capaz de unirse a las VMMA. Sin embargo, cuando la protoxina interactúa con las membranas de la línea resistente (NO-QA) no es capaz de formar oligómero que se una a las VMMA. Por otro lado la protoxina de Cry1AbMod es capaz de interactuar con las membranas y formar un oligómero que puede unirse a ambas líneas (figura 9). Cuando la protoxina de las Cry1As interacciona con las VMMA se induce la formación de un oligómero capaz de interactuar a su vez con los segundos receptores y de insertarse en la membrana. Se confirma así que la inducción de la oligomerización de la protoxina se encuentra afectada en la membrana del insecto resistente de *P. xylostella*.

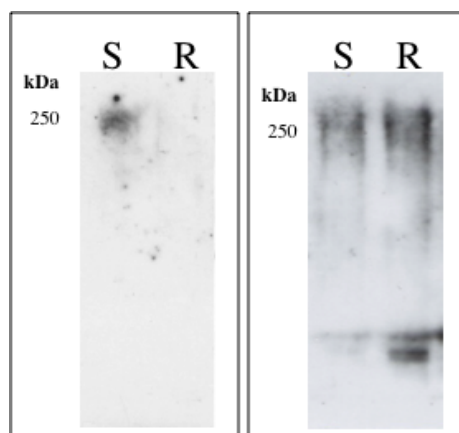


Figura 9.- Unión de la protoxina de Cry1Ab silvestre y Cry1AbMod a VMMA de *P. xylostella* sensible (LAB-P) y resistente (NO-QA).

### 8.7 Ensayos de inmunoprecipitación para buscar nuevos receptores de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac silvestres y modificadas en *P. xylostella* sensible (LAP-B) y resistente (NO-QA)

El propósito de este experimento fue buscar proteínas que fueran capaces de unir a las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac en la línea sensible, pero no en la resistente con el objetivo de encontrar posibles receptores alternos a la caderina. Para esto se hicieron ensayos de inmunoprecipitación de las proteínas que se unieron a las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac silvestres a las VMMA de *P. xylostella* sensible (LAP-B) y resistente (NO-QA) utilizando perlas de proteína A-Sepharosa C-4B. Estas perlas fueron incubadas con anticuerpo  $\alpha$ -Cry1Ab o  $\alpha$ -Cry1Ac. Por otro lado se llevaron a cabo las uniones de las VMMA de *P. xylostella* sensible y resistente a las protoxinas de Cry1Ab y Cry1Ac. La pastilla obtenida de esta interacción fue solubilizada. Finalmente las perlas interaccionaron con la fracción soluble obtenida anteriormente, con el propósito de que el anticuerpo unido a las perlas interaccionara con las proteínas (Cry1Ab y Cry1Ac) unidas a distintos receptores.

Se realizaron electroforesis y en ellas se pudo ver una banda abundante correspondiente al peso aproximado de 70 kDa en la línea sensible, mientras que en la línea resistente dicha banda se ve muy disminuida. Esta banda fue recortada y enviada a la unidad de secuenciación para intentar identificarla (figura 10). En esta tesis no se discute el resultado completo debido a que todavía no se cuenta con la secuencia.

A las proteínas inmunoprecipitadas también se les realizó un Ligand blot. Se incubaron las toxinas Cry1Ac y Cry1Ab silvestres marcadas con biotina con la membrana obtenida de las proteínas inmunoprecipitadas que se unieron a las VMMA antes mencionadas. En este Ligand blot

se volvió a encontrar la misma proteína de 70 kDa y otra accesoria de aproximadamente 125 kDa. Lo que puede indicarnos que sí existen otras proteínas además de la caderina en este insecto que están fungiendo como primeros receptores.

La presencia de esta proteína podría explicar por qué *P. xylostella* es resistente a las toxinas Cry1As, ya que al tener un receptor distinto de la caderina que es blanco de dichas toxinas, es capaz de evadir su acción tóxica y por ende, evadir la muerte por la ingesta de éstas.

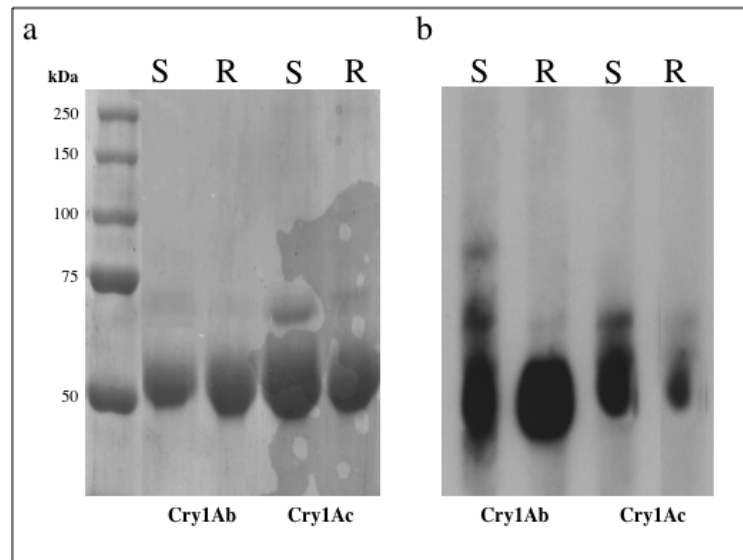


Figura 10.- Ensayos de inmunoprecipitación para buscar receptores de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac en *P. xylostella*. En la figura 10a se observa un gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de la inmunoprecipitación de la unión de las protoxinas de Cry1Ab y Cry1Ac, en él se puede observar una proteína de aproximadamente 70 kDa presente sólo en la línea sensible y no en la resistente. En la figura 10b se observa un ligand blot contra toxinas de Cry1Ab y Cry1Ac marcadas con biotina de las uniones en la figura 10a. En esta figura también se observa la proteína de 70 kDa presente en la línea sensible y menos abundante en la línea resistente.

## 9. Discusión

Los resultados presentados en este trabajo de los experimentos de unión con las toxinas en forma de monómero, coinciden con aquellos presentados por Masson *et al.* en 1995, ya que se observa que la toxina Cry1Ac se asocia tanto a las vesículas de *P. xylostella* sensibles como a las resistentes, pero no coinciden con los datos presentados por Tabashnik *et al.* en 1994, debido a que él reporta que la toxina Cry1Ac no une a las vesículas resistentes.

En los datos obtenidos con la especie *P. gossypiella* existe un poco de discrepancia con el reporte de González *et al.*, 2003, ya que en ese trabajo se presenta que la unión de la toxina Cry1Ac a VMMA no se encuentra severamente afectada, mientras que la unión de la toxina Cry1Ab a VMMA sí está muy afectada, lo cual contrasta con los resultados presentados en esta tesis, ya que aquí se determinó que no existe diferencia en cuanto a la unión de ninguna de las dos toxinas a las VMMA, ya que ambas son capaces de unir tanto a las membranas sensibles como a las resistentes de *P. gossypiella*. Cabe mencionar que en ninguno de los trabajos antes realizados con uniones a vesículas de estos insectos resistentes se trabajó con el oligómero o con la protoxina, sino solamente con la toxina activada (65 kDa).

Al parecer, los problemas presentados en el marcaje del oligómero se deben al gran volumen de la biotina ya que puede ser éste quien le impide introducirse del todo en la estructura del oligómero para marcar las lisinas, ya que al parecer las lisinas del oligómero se encuentran escondidas. Debido a que con el análisis de la unión del oligómero de Cry1AbMod se encontró que éste es capaz de unirse tanto a la línea LAB-P como a la NO-QA se puede sugerir que la resistencia no está ligada a cambios en la unión del oligómero.

En este trabajo se muestra que es la unión de la protoxina de Cry1Ab a las VMMA la que presenta diferencias considerables cuando se analiza su interacción con las membranas de insectos resistentes o sensibles de *P. xylostella*, debido a que la toxina silvestre es capaz de formar un oligómero que se une únicamente a la línea sensible y no a la resistente. La interacción de la protoxina modificada con las membranas de insectos resistentes y sensibles no presenta cambios, a diferencia de la toxina silvestre. Además, en estudios previos de *P. xylostella* sólo se ha trabajado con la toxina Cry1Ac, y en este trabajo se muestra también la unión de Cry1Ab, dando así un enfoque más integral del mecanismo de resistencia de estos lepidópteros hacia las toxinas Cry1As.

En el caso de *P. gossypiella*, se pudo comprobar que la línea resistente carece de caderina mediante ensayos tipo Western blot usando anticuerpos  $\alpha$ -caderina. Además también se pudo verificar que en *P. xylostella* la caderina se encuentra intacta, ya que los Western blot muestran que dicha proteína se encuentra presente en ambas líneas.

Los insectos resistentes al parecer son sensibles a las toxinas modificadas, ya que éstas son capaces de unirse a las membranas de ambos insectos resistentes en cualquiera de sus formas (monómero, protoxina u oligómero) indicando así que las toxinas modificadas son capaces de saltarse alguno de los pasos del mecanismo de acción de las toxinas silvestres, siendo capaces de formar oligómero en las membranas de dichos insectos resistentes, así como en las de los sensibles.

Estos datos muestran que el mecanismo de resistencia en los dos insectos se debe a la falta de un receptor que facilita la oligomerización de las toxinas Cry1A siendo en el caso de *P. gossypiella* la caderina. Falta identificar el receptor responsable de la oligomerización de las toxinas Cry1A en *P. xylostella*.

## 10. Conclusiones

De acuerdo a los resultados reportados en esta tesis se puede concluir que:

1. El receptor caderina se expresa en ambas líneas de *P. xylostella* (sensible y resistente), y en la línea sensible de *P. gossypiella*.
2. El receptor APN se expresa en ambas líneas de *P. xylostella* (sensible y resistente), y también en ambas líneas de *P. gossypiella* (sensible y resistente).
3. La resistencia parecería no encontrarse relacionada con la unión de la toxina o del oligómero de Cry1Ab y Cry1Ac a las VMMA aisladas de insectos resistentes, ya que la unión es semejante a la que se observa en las membranas de los insectos sensibles tanto en *P. xylostella* como en *P. gossypiella*.
4. Las diferencias importantes entre la línea sensible y resistente de *P. xylostella* están relacionadas con la interacción de la protoxina Cry1Ab con las VMMA. La interacción de la protoxina con las VMMA de insectos sensibles induce la formación de oligómero, que puede ser detectado mediante la unión a las membranas. Por el contrario, la interacción de la protoxina con las VMMA de insectos resistentes no induce la formación de oligómero.
5. En *P. xylostella*, la membrana de insectos resistentes expresan en menor cantidad una proteína de 70 kDa que inmunoprecipita con las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac en membranas de insectos sensibles.

Estos datos pueden ser la base para proponer que en *P. xylostella* existe un receptor alternativo que no está presente en los insectos resistentes, lo que interfiere de manera directa con la producción de oligómero de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac.

## 11. Perspectivas

Las perspectivas para este trabajo son hacer la identificación de la proteína de 70 kDa encontrada por los ensayos de inmunoprecipitación, de esta manera, una vez obtenidos estos datos, se podrían hacer experimentos en los que se silencie dicha proteína para ver qué papel desempeña tanto en el mecanismo de acción de la toxina como en la toxicidad de ésta, viendo cómo interfiere con la oligomerización de la toxina.

## 12. Referencias

- 1.- Abbott Laboratories. *Bt Products Manual*. North Chicago, IL: Abbott; 1992.
- 2.- Abdullah MA, Valaitis AP, Dean DH. 2006. Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochem.* 7:16.
- 3.- Atsumi S, Mizuno E, Hara H, Nakanishi K, Kitami M, Miura N, Tabunoki H, Watanabe A, Sato R. 2005. Location of the *Bombix mori* aminopeptidase N type 1 binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3966-77.
- 4.- Barrios A, Oliveros O, Sánchez C, Huerta E, Acevedo F. 2006. El análisis de riesgo en la liberación de organismos vivos modificados. *Biodiversitas.* 67:6-11.
- 5.- Ballester V, Granera F, Tabashnik BE, *et al.* 1999. Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in susceptible and resistant larvae of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Applied and Environmental Microbiology.* 65 (4): 1413-19.
- 6.- Baxter SW, Zhao JZ, Shelton AM, *et al.* 2008. Genetic zapping of Bt-toxin binding proteins in a Cry1A-toxin-resistant strain of diamondback moth *Plutella xylostella*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 38: 125-35.
- 7.- Bravo A, Gómez I, Conde J, *et al.* 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et biophysica acta.* 1667(1):38-46.
- 8.- Bravo A, Soberón M. 2008. How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends in Biotechnology.* 26:573-79.
- 9.- Burton SL, Ellar DJ, Li J, Derbyshire DJ. 1999. N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognized by a site on the domain III lectin-like fold of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J. Mol. Biol.* 287:1011-1022.

- 10.- CEPA. Pesticide info: What you should know about pesticides. DPR: A Department of the California Environmental Protection Agency. E13/June 2003.
- 11.- Chen J, Brown MR, Hua G, Adang MJ. 2005. Comparison of the localization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A delta endotoxins and their binding proteins in larval midgut of tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res.* 321:123-129.
- 12.- Cooper MA, Carroll J, Travis E, Williams DH, Ellar DJ. 1998. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin interaction with *Manduca sexta* aminopeptidase N in a model membrane environment. *Biochem. J.* 333:677-683.
- 13.- de Maagd RA, Bosch D, Stiekema W. 1999. toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 4(1):9-13.
- 14.- de Maagd RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N, Schnepf E. 2003. Structures, Diversity, and evolution of proteína toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 37:409-33.
- 15.- Dorsch JA, Candas M, Griko NB, Maaty WS, Midboe EG, Vadlamudi RK, Bulla LA Jr. 2002. Cry1A toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a region adjacent to the membrane-proximal extracellular domain of BT-R(1) in *Manduca sexta*: involvement of a cadherin in the entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32:1025–1036.
- 16.- FAO. El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2001. FAO. 2001.
- 17.- Fernandez LE, Aimanova KG, Gill SS, Bravo A, Soberón M. 2006. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem. J.* 394:77-84.
- 18.- Forcada C, Alcacer E, Garcera MD, Tato A, Martínez R. 1999. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: proteolytic and SEM study of the larval midgut. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 42(1):51-63.



- 19.- Francis BR, Bulla LA Jr. 1997. Further Characterization of BT-R<sub>1</sub>, the Cadherin-like Receptor for Cry1Ab Toxin in Tobacco Hornworm (*Manduca Sexta*) Midguts. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27(6):541-550.
- 20.- Gahan LJ, Gould F, Heckel DG. 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*. 293(5531):857-60.
- 21.- Gómez I, Oltean DI, Sánchez J, Gill SS, Bravo A, Soberón M. 2001. Mapping the epitope in Cadherine-like receptores involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. *J. Biol. Chem.* 276:28906-28912.
- 22.- Gómez I, Sánchez J, Miranda R, Bravo A., Soberón M. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix a-1 in domain I and oligomer pre-pore formtion of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* 513:242-246.
- 23.- Gómez I, Dean DH, Bravo A, Soberón M. 2003. Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity, tow estructural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R<sub>1</sub> receptor interact with asas a-8 and 2 in domain II of Cry1Ab toxin. *Biochemistry.* 42: 10482-10489.
- 24.- Gómez I, Arenas I, Benítez I, Miranda-Ríos J, Becerril B, Grande R, Almagro JC, Bravo A, Soberón M. 2006. Specific epitopes of domain II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N in *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* 281(45):34032-9.
- 25.- González-Cabrera J, Escriche B, Tabashnik BE, Ferré J. 2003. Binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in resistant and susceptible strains of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 3: 929-935.
- 26.- Grochulski P, Masson L, Borisova S, Pusztai-Carey M, Schwartz JL, Brousseau R, Cygler M. 1995. *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) insecticidal toxin, cristal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254:447-464.

- 27.- Gunning RV, Dang HT, Kemp FC, Nicholson IC, Moores GD. 2005. New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(5):2558-63.
- 28.- Herrero S, Gechev T, Bakker PL, Moar WJ, de Maagd RA. 2005. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expresión of one of four Aminopeptidase N genes. *BMC Genomics.* 6:96.
- 29.- Higuchi M, Haginoya K, Takanori Y, *et al.* 2007. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins to brush border membrane vesicles of midgut from Cry1Ac susceptible and resistant *Plutella xylostella*. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 147: 716-24.
- 30.- Hua G, Zhang R, Abdullah MA, Adang MJ. 2008. *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. *Biochemistry.* 47:5101-10.
- 31.- Janmaat AI, Myers J. 2003. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in green house populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proc. Biol. Sci.* 270(1530):2263-70.
- 32.- Jenkins JL, Dean DH. 2000. Exploring the mecanismo of action of insecticidal proteins by genetic engineering methods. *Genet. Eng.* 22:33-54.
- 33.- Jiménez-Juárez N, Muñoz-Garay C, Gómez I, Saab-Rincon G, Damian-Alamazo JY, Gill SS, Soberón M, Bravo A. 2007. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. *The Journal of Biological Chemistry.* 282(29):21222-21229.
- 34.- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-5.
- 35.- Li JD, Carroll J, Ellar DJ. 1991. Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature.* 353:815-821.

- 36.- Luo K, Tabashnik BE, Adang MJ. 1997. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin to aminopeptidase in susceptible and resistant diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Applied Environmental Microbiology*. 63 (3): 1024-27.
- 37.- Ma G, Roberts H, Sarjan M, Featherstone N, Lahnstein J, Akhurst R, Schmidt O. 2005. Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae? *Insect Biochem Mol Biol*. 35(7):729-39.
- 38.- McGaughey WH, Gould F, Gelernter W. 1998. Bt resistance management. *Nat Biotechnol*. 16(2):144-6.
- 39.- Masson L, Mazza A, Brousseau R, Tabashnik B. 1995. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* toxin binding with Brush Border Membrane Vesicles from susceptible and resistant larvae of *Plutella xylostella*. *The Journal of Biological Chemistry*. 20:11887-96.
- 40.- Masson L, Lu YJ, Mazza A, Brousseau R, Adang MJ. 1995. The Cry1A(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. *The Journal of Biological Chemistry*. 270(35):20309-15.
- 41.- Mendelson M, Kough J, Vaituzis Z, Matthews K. 2003. Are Bt crops safe? *Nature Biotechnol*. 21:1003-09.
- 42.- Morin S, Biggs RW, Sisterson MS, Shriver L, Ellers-Kirk C, Higginson D, Holley D, et al. 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *PNAS*. 100(9):5004-5009.
- 43.- Muñoz-Garay C, Portugal L, Pardo-López L, Jiménez-Juárez N, Arenas I, Gómez I, Sánchez-López R, Arroyo R, Holzenburg A, Savva CG, Soberón M, Bravo A. 2009. Characterization of the mechanism of action of the genetically modified Cry1AbMod toxin that is active against Cry1Ab-resistant insects. *Biochim Biophys Acta*. 1788(10):2229-37.
- 44.- Nagamatsu Y, Koike T, Sasaki K, Yoshimoto A, Furukawa Y. 1999. The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal. *FEBS Lett*. 460:3865-390.

- 45.- Nakanishi K, Yaoi K, Nagino Y, Hara H, Kitami M, Atsumi S, Miura N, Sato R. 2002. Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombix mori* and *Plutella xylostella*, their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Cy1A toxin. *FEBS Lett.* 519:215-20.
- 46.- Ochoa-Campuzano C, Real MD, Martínez-Ramírez AC, Bravo A, Rausell C. 2007. An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 362:437-442.
- 47.- Oppert B, Kramer KJ, Johnson D, Upton SJ, Mcgaughey WH. 1996. Luminal proteinases from *Plodia interpunctella* and the hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) protoxin. *Insect Biochem Mol Biol.* 26(6):571-83.
- 48.- Pacheco S, Gómez I, Arenas I, Saab-Rincon G, Rodríguez-Almazán C, Gill SS, Bravo A, Soberón M. 2009. Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a “ping pong” binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. *J. Biol. Chem.* 284(47):32750-7.
- 49.- Pardo-López L, Muñoz-Garay C, Porta H, Rodríguez-Almazán C, Soberón M, Bravo A. 2009. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Peptides.* 30(3):589-95.
- 50.- Pigott CR, Ellar DJ. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 71(2):255-281.
- 51.- Rajamohan F, Lee MI, Dean DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: Molecular mode of action. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.* 60:1-26.
- 52.- Rahman MM, Roberts HL, Sarjan M, Asgari S, Schmidt O. 2004. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(9):2696-9.

- 53.- Rahman MM, Roberts HL, Schmidt O. 2007. Factors affecting growth in the koinobiont endoparasitoid *Venturia canescens* in the flour moth *Ephestia kuehniella*. *J Insect Physiol.* 53(5):463-7.
- 54.- Rodríguez-Almazán C, Zavala LE, Muñoz-Garay C, Jiménez-Juárez N, Pacheco S, Masson L, Soberón M, Bravo A. 2009. Dominant negative mutants of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin function as anti-toxins: demonstration of the role of oligomerization in toxicity. *PLoS One.* 4(5):e5545.
- 55.- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum JR, Feitelson J, Zeigler D, Dean DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Mol. Biol. Rev.* 62:705-806.
- 56.- Soberón M, Pardo-López L, López I, Gómez I, Tabashnik BE, Bravo A. 2007. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science.* 318:1640-42.
- 57.- Soberón M, Gill SS, Bravo A. 2009. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill their target insects? *Cellular and Molecular Life Science.* 66(8):1337-49.
- 58.- Tabashnik BE, Cushing N L, Finson N, Johnson M W. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J Econ Entomol.* 83:1671-1676.
- 59.- Tabashnik BE, Finson N, Groeters FR, et al. 1994. Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 42120-24.
- 60.- Tabashnik BE. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 39:47-49.
- 61.- Tabashnik BE, Malvar T, Liu YB, et al. 1996. Cross-resistance of diamondback moth indicates altered interactions with domain II of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Applied Environmental Microbiology.* 62(8): 2839-44.
- 62.- Tabashnik BE, Liu Y, Finson N, et al. 1997. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:1640-44.

- 63.- Tabashnik BE, Liu YB, Malvar T, et al. 1997. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 12780-85.
- 64.- Tabashnik BE, Patin AL, Dennehy TJ, Liu YB, Carrière Y, Sims MA, Antilla L. 2000. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. *PNAS.* 97(24):12980-12984.
- 65.- Tabashnik BE, Dennehy TJ, Carrière Y. 2005. Delayed resistance to transgenic cotton in pink bollworm. *PNAS.* 102(43):15389-93.
- 66.- Tabashnik BE. 2008. Delaying insect resistance to transgenic crops. *PNAS.* 105(49): 19029-30.
- 67.- Vadlamudi RK, Ji TH, Bulla LA Jr. 1993. A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* supsp. *berliner*. *J. Biol. Chem.* 268:12334-12340.
- 68.- Vadlamudi RK, Weber E, Ji I, Ji TH, Bulla LA Jr. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270:5490-5494
- 69.- Xie R, Zhuang M, Ross LS, Gómez I, Oltean DI, Bravo A, Soberón M, Gill SS. 2005. Single amino acid mutations in the cadherine receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. *J. Biol. Chem.* 280:8416-8425.
- 70.- Xu X, Yu L, Wu Y. 2005. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac {delta}-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Appl Environ Microbiol.* 71(2):948-54.
- 71.- Xue JL, Cai QX, Zheng DS, Yuan ZM. 2005. The synergistic activity between Cry1Aa and Cry1C from *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. *Lett Appl Microbiol.* 40(6):460-5.

72.- Yaoi K, Kadotani T, Kuwana H, Shinkawa A, Takahashi T, Iwahana H, Sato R. 1997. Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Eur. J. Biochem.* 246:652–657.

73.- Zhang X, Candas M, Griko NB. 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 USA.* 103(26):9897-902.

74.- Zhuang M, Oltean DI, Gómez I, Pullikuth AK, Soberón M, Bravo A, Gill SS. 2002. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to midgut epithelium and subsequent pore formation. *J. Biol. Chem.* 277:13863-13872.