



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**“Análisis del papel de la región  $\beta$ 16 del dominio III de la toxina  
Cry1Ca de *Bacillus thuringiensis* en toxicidad contra *Manduca  
sexta*”**

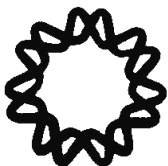
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**LIC. EN CIENCIAS JOSUÉ OCELOTL OVIEDO**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. ISABEL GÓMEZ GÓMEZ**



**CUERNAVACA, MORELOS**

**2011**



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.

**Dedico este trabajo a la memoria de Perla Oviedo Moreno (1971-2011).**

“Jag sitter och skakar  
Glädje och förtvivlan blandat  
Likt vatten med den sötaste saft  
Strypgreppet som livet håller om min hals  
Är för en stund släppt, jag kan äntligen andas  
För första gången på vad som känns som en evighet  
Känner jag mig glad  
Tyngd, men samtidigt lättad

Jag darrar av eufori som sliter och river i mig  
Vill dra mig bort härifrån till någon plats  
Där ljuset och skuggorna lever i samspel  
Och dansar livets vals med mig in i döden

Kom och dansa med mig, låt oss sjunga tillsammans  
Skutta omkring i gläntorna, skrattandes  
Och för en stund bara finnas till  
För ingenting, just ingenting  
Den totala avsaknaden utav allt  
Är just allt  
Just nu, just då  
Alltid, aldrig”

*-Alltid-Aldrig, Lifelover-*

Esta tesis fue realizada bajo la asesoría de la Dra. Isabel Gómez Gómez, en el laboratorio del Dr. Mario Soberón Chávez, del Departamento de Microbiología Molecular, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## Agradecimientos

Dra. Isabel Gómez, a quien le tengo un gran respeto y admiración por ser una persona que realiza su trabajo con excelencia. Mi más profundo agradecimiento por compartir tus conocimientos conmigo, por tu paciencia cuando los experimentos no salían, por los consejos y la guía para realizar este trabajo.

Dr. Mario Soberón y Dra. Alejandra Bravo, por permitirme realizar este proyecto en su laboratorio y las observaciones hechas al mismo durante los seminarios de grupo los cuales me permitieron enriquecer este trabajo.

Dr. José Luis Puente y Dr. José Luis Reyes, gracias por las críticas constructivas realizadas a este trabajo a lo largo de los tutorales, por impulsarme a mejorar mi capacidad crítica y de análisis.

Dr. Baltazar Becerril, Dra. Cinthia Nuñez, Dr. Edmundo Castillo, Dra. Nina Pastor y al Dr. Víctor Bustamante, por formar parte del jurado revisor de esta tesis, tener la amabilidad de leer el escrito y hacer las correcciones pertinentes. Por realizar cuestionamientos que me permitieron comprender mejor los resultados obtenidos.

A mis padres, Josué Ocelotl y Elizabeth Oviedo por brindarme su apoyo incondicional e impulsarme día con día, gracias a ustedes he alcanzado mis metas.

A mis hermanos Jeremy y José Pablo por las experiencias que hemos vivido juntos, sé que siempre contaré con ustedes.

Erika Andelsky Estrada Castañeda, siempre serás una persona importante para mí, marcaste mi vida y aprendí mucho de ti. Gracias por tu apoyo.

A mis amigos y compañeros dentro del instituto y del laboratorio, son muchos así que si olvido enlistar a alguien les ofrezco una gran disculpa. Karla, Biviana, Esmeralda, Luis, Emilliano, Odín, "Georgie", Adriana, Fabricio, Elida, Aimée, Alejandra, "Goni", Cristina, Daniela, Diana, Fernando, Ángeles, Raquel, Iván, Sabino, Gladys, Violeta, Alan, Jazmín, Leivi, Betty, Mónica, Leidy, "George", Liz, Abiud, Graciela, Claudia Pérez, Dra. Claudia Rodriguez, Dra. Liliana Pardo, Dra. Helena Porta, Dr. Carlos Garay, Dra. Blanca García, "Checo" y Xóchitl. Ya sea por las entretenidas conversaciones, salidas o por la ayuda con protocolos o cuestiones experimentales.

A mis amigos fuera de este Instituto, Marcos, Emmanuel, Roger, Liz y Tania. Si he olvidado a alguien una enorme disculpa. Por las pláticas, ratos de ocio, y por supuesto el apoyo que me brindaron.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca que me permitió financiar mis estudios de maestría y la realización de este proyecto.

Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado en una institución de excelencia.

## Índice

Resumen.....	12
Introducción.....	13
<i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt): características generales y uso como biopesticida.....	15
Clasificación de las toxinas Cry.....	17
Estructura y función de las toxinas Cry.....	19
Dominio I .....	20
Dominio II.....	21
Dominio III.....	22
Modo de acción de las toxinas Cry.....	23
Solubilización.....	23
Procesamiento proteolítico.....	23
Interacción con los receptores.....	24
Oligomerización.....	24
Interacción del oligómero con receptores anclados por GPI.....	24
Antecedentes Particulares.....	25
Estudios funcionales sobre el dominio III de las toxinas Cry.....	25
Mutaciones en el dominio III de toxinas Cry1 afectan la toxicidad .....	29
Hipótesis.....	32
Objetivo General .....	32
Objetivos Particulares .....	32
Materiales y Métodos.....	33
Cepas utilizadas.....	33
Fosforilación de oligonucleótidos mutagénicos.....	33
Mutagénesis sitio dirigida. ....	35
Preparación y transformación de células electrocompetentes DH5 $\alpha$ de <i>E. coli</i> .....	35
Secuenciación de ADN. ....	37
Preparación y transformación de células competentes de Ca <sup>2+</sup> SCS110 de <i>E. coli</i> . ....	38
Preparación y transformación de células vegetativas de la cepa 407 Cry- de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	39
Producción y purificación de cristales.....	40

Cuantificación de Proteína.....	41
Solubilización y tripsinación de las toxinas Cry1Ca y Cry1Ab y sus mutantes.....	41
Bioensayos de toxicidad.....	42
Cálculo de la dosis letal media (LC <sub>50</sub> ).....	42
Purificación de Vesículas de la Microvellosidad Media Apical (VMMA's) del intestino de <i>M. sexta</i> .....	43
Marcaje de toxinas con biotina para ensayos de unión.....	44
Ensayo de unión.....	45
Modelado molecular.....	46
Soluciones y medios de cultivo.....	47
Composición de geles de poliacrilamida para electroforesis en condiciones desnaturalizantes.....	51
Composición y preparación de la dieta artificial de <i>M. sexta</i> .....	51
Resultados y discusión.....	51
La toxina Cry1Ca como un bioinsecticida potencial.....	52
Mutagénesis sitio dirigida.....	55
Análisis de la expresión de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ca silvestres y sus mutantes.....	56
Solubilización y activación con tripsina de la toxinas Cry1Ab y Cry1Ca silvestres y sus mutantes.....	58
Análisis de toxicidad de las mutantes de la región $\beta$ 16 del dominio III de la toxina Cry1Ca.....	62
Toxicidad de las mutantes de la toxina Cry1Ca probadas como cristales, protoxina y toxina activa.....	63
Comparación de la toxicidad de las proteínas mutantes en su forma activa con sus respectivas formas protóxicas y cristales.....	64
Análisis de toxicidad de las variantes sobre la asparagina 514 de la toxina Cry1Ab.....	65
Ensayo de unión de la toxina Cry1Ca y sus mutantes a VMMA's de <i>M. sexta</i> .....	67
Análisis de la estructura tridimensional teórica de las toxinas Cry1Ca y Cry1Ab.....	68
Mutagénesis y análisis del residuo conservado S590 de la región $\beta$ 22 de la toxina Cry1Ca.....	72
Conclusiones.....	76
Perspectivas.....	77
Literatura citada.....	78



## Índice de tablas.

Tabla I. Compuestos químicos empleados como insecticidas.....	14
Tabla II. Dosis letal media de toxinas Cry parentales y quimeras.....	26
Tabla III. Dosis letal media de mutantes en el dominio III de la toxina Cry1Ac.....	30
Tabla IV. Oligonucleótidos para la mutagénesis de la región $\beta$ 16 de la toxina Cry1Ca.....	34
Tabla V. Condiciones del programa utilizado en la PCR mutagénica.....	36
Tabla VI. Comparación de las dosis letales medias de toxinas de la subclase Cry1A y Cry1Ca probadas en distintos insectos.....	53
Tabla VII. Dosis letal media de la proteína Cry1Ca y de sus mutantes sobre la región $\beta$ 16 del dominio III.....	54
Tabla VIII. Dosis letal media de la proteína Cry1Ca y las mutantes sobre la región $\beta$ 16 del dominio III.....	64
Tabla IX. Dosis letal media de los cristales de la proteína Cry1Ab y las variantes sobre la asparagina 514.....	66

## Índice de figuras.

Figura 1. Esporangio de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	17
Figura 2. Filogenia de las toxinas Cry.....	18
Figura 3. Estructura cristalina de las toxinas Cry.....	19
Figura 4. Dominios funcionales de las toxinas Cry .....	21
Figura 5. Modo de acción de las toxinas Cry.....	25
Figura 6. Unión de quimeras de la toxina Cry1Ac a APN de <i>Lymantria dispar</i> .....	27
Figura 7. Localización de las láminas $\beta$ 16 y $\beta$ 22 en el dominio III de la toxina Cry1Aa/Competencia de unión con péptidos sintéticos.....	28

Figura 8. Esquema general de mutagénesis.....	36
Figura 9. Alineamiento de la lámina $\beta$ 16 de las toxinas Cry1Ca y Cry1Ab .....	54
Figura 10. Representación de las mutantes sobre la lámina $\beta$ 16 del dominio III de la toxina Cry1Ca.....	56
Figura 11. Expresión de las toxinas Cry1Ca y Cry1Ab silvestres y de sus respectivas mutantes.....	57
Figura 12. Solubilización de las toxinas Cry1Ca y Cry1Ab silvestres y de sus respectivas mutantes.....	60
Figura 13. Activación con tripsina de las toxinas Cry1Ca y Cry1Ab silvestres y de sus respectivas mutantes.....	61
Figura 14. Fracciones de los cristales purificados de la toxina Cry1Ca y de las mutantes en la región $\beta$ 16 del dominio III.....	62
Figura 15. Ensayo de unión de la toxina Cry1Ca silvestre y de las mutantes en la región $\beta$ 16 del dominio III a VMMA's purificadas a partir del tejido intestinal de <i>M. sexta</i> . .....	67
Figura 16. Modelos tridimensionales teóricos del dominio III de las toxinas Cry1Ca y Cry1Ab.....	69
Figura 17. Superposición de la estructura tridimensional teórica de las variantes sobre la N514 de la lámina $\beta$ 16 con la toxina Cry1Ab silvestre.....	71
Figura 18. Alineamiento de la región $\beta$ 22 del dominio III de las toxinas Cry1Ca y Cry1Ab.....	72
Figura 19. Orientación de la serina conservada en la lámina $\beta$ 16 del dominio III de la toxina Cry1Ca.....	73
Figura 20. Solubilización, expresión y procesamiento de la mutante S590A localizada en la región $\beta$ 22 de la proteína Cry1Ca.....	74

## Lista de abreviaturas

<b>ALP</b>	<b>Fosfatasa alcalina.</b>
<b>ADN</b>	<b>Ácido desoxirribonucleico.</b>
<b>APN</b>	<b>Aminopectidasa.</b>
<b>APS</b>	<b>Persulfato de amonio.</b>
<b>ATP</b>	<b>Trifosfato de adenosina.</b>
<b>BHI</b>	<b>Infusión cerebro corazón.</b>
<b>BmAPN1</b>	<b>Aminopectidasa N1 de <i>Bombyx mori</i>.</b>
<b>Bt</b>	<b><i>Bacillus thuringiensis</i>.</b>
<b>CADR</b>	<b>Receptor caderina.</b>
<b>C-terminal</b>	<b>Carboxilo terminal.</b>
<b>DMSO</b>	<b>Dimetil sulfóxido.</b>
<b>D.O.<sub>600</sub></b>	<b>Densidad óptica a 600 nm.</b>
<b><i>E.coli</i></b>	<b><i>Escherichia coli</i>.</b>
<b>GPI</b>	<b>Glicosilfosfatidilinositol.</b>
<b><i>H. armígera</i></b>	<b><i>Helicoverpa armígera</i>.</b>
<b>HCT</b>	<b>Medio mínimo de esporulación.</b>
<b><i>H. virescens</i></b>	<b><i>Heliothis virescens</i>.</b>
<b>kDa</b>	<b>Kilodaltones.</b>
<b>LB</b>	<b>Medio Luria-Bertani.</b>
<b><i>M. sexta</i></b>	<b><i>Manduca Sexta</i>.</b>

<b>PCR</b>	<b>Reacción en cadena de la polimerasa.</b>
<b>PMSF</b>	<b>Fluoruro de fenilmetanosulfonilo.</b>
<b>PNK</b>	<b>Cinasa de polinucleotidos.</b>
<b><i>S.exigua</i></b>	<b><i>Spodoptera exigua.</i></b>
<b>SDS</b>	<b>Dodecilsulfato de sodio.</b>
<b>SOB</b>	<b>Medio óptimo de crecimiento, adicionado con glucosa.</b>
<b><i>ssp.</i></b>	<b>Subespecie.</b>
<b>VMMA's</b>	<b>Vesículas de la microvellosidad media apical.</b>
<b>YENB</b>	<b>Medio rico bajo en sales.</b>

## Resumen.

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria gram-positiva formadora de esporas que sintetiza una inclusión cristalina formada por  $\delta$ -endotoxinas Cry. Dentro de éstas, las proteínas de la familia Cry1A, que son tóxicas contra distintos lepidópteros, han sido estudiadas de manera extensiva. Sin embargo, a pesar de que la proteína Cry1Ca tiene un espectro insecticida, que incluye a insectos plaga que no se controlan de manera adecuada por proteínas Cry1A, ésta ha sido poco estudiada.

Recientemente se ha involucrado a dos regiones ubicadas en el dominio III de las proteínas Cry1Aa y Cry1Ab en la toxicidad: la lámina  $\beta$ 16 y la lámina  $\beta$ 22. En el presente estudio analizamos el papel de la región conservada  $\beta$ 16 del dominio III de la toxina Cry1Ca en la actividad contra el lepidóptero *Manduca sexta*, para ello se construyeron mutantes sencillas cambiando los seis residuos que comprenden la lámina  $\beta$ 16 por alanina y se evaluó el efecto de estos cambios en la toxicidad y unión a vesículas. Los resultados obtenidos en bioensayos sugieren que en el caso de la toxina Cry1Ca las, láminas  $\beta$ 16 y  $\beta$ 22 no son las más importantes para la toxicidad. Esto fue corroborado en ensayos de unión a VMMA's de *M. sexta*, ya que todas las mutantes con alanina se unen de manera similar a la toxina silvestre.

Por otro lado, realizamos una mutagénesis a saturación sobre el residuo de asparagina en la posición 514 de la toxina Cry1Ab para evaluar su efecto sobre la toxicidad. Esto con base en estudios en los que se ha observado que al mutar residuos de asparagina en regiones de interacción, se afecta la toxicidad de la toxina Cry1Ac. Se obtuvieron nueve variantes de las cuales tres resultaron en una disminución de 1 a 3 veces en la toxicidad. Lo anterior sugiere que este residuo de asparagina puede estar jugando un papel preponderante en la toxicidad de la proteína Cry1Ab en contra de *Manduca sexta*, aunque no necesariamente es el más importante.

## Introducción

El rápido crecimiento de la población mundial ha impuesto nuevos retos en la comunidad agrícola (Avisar et al., 2009). Factor que ha conducido al desarrollo de estrategias de control de plagas altamente eficientes intentando minimizar las pérdidas de cultivos a nivel mundial (Gatehouse, 2008). En efecto, las plagas de insectos representan la principal amenaza para la producción de alimentos de consumo humano. Sin el uso de insecticidas químicos hubieran ocurrido pérdidas dramáticas en cosechas a nivel mundial (FAO, 2001). Los lepidópteros en su forma larvaria son considerados los insectos más destructivos.

Durante el siglo 20 las técnicas de control de plagas evolucionaron de manera intensiva, particularmente en la segunda mitad del siglo. Antes de 1950 entre las herramientas de protección de cultivos se tenían unos pocos compuestos químicos que incluían sales de arsénico y cobre. En la Tabla I se describen los principales compuestos químicos que se han empleado como pesticidas a lo largo de la historia. El empleo de estas sustancias para el control de plagas somete a las poblaciones de insectos a una selección Darwiniana y su resultado inevitable ha sido el desarrollo de resistencia a estos pesticidas (Brogdon y Mc Allister, 1998; Raymond-Delpech et al., 2005).

Como resultado de la preocupación por la provisión de alimentos, conservación del medio ambiente y la salud de los agricultores, se han buscado alternativas que sean específicas, efectivas y que no sean contaminantes. Los insecticidas biológicos o biopesticidas son una opción que cumple estos requisitos. Los biopesticidas se derivan de organismos naturales o sus productos los cuales se emplean para el control de plagas (Bishop 1994; Nicholson 2007). Entre los diferentes agentes de control biológico con mayor potencial, las bacterias patógenas de insectos han sido las más estudiadas (Rajamohan et al., 1998). Hoy en día el biopesticida más utilizado es *Bacillus 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 (Pardo-López et al., 2008).

**Tabla I.** Compuestos químicos orgánicos empleados como insecticidas†.

Grupo Químico	Periodo de empleo	Efectos sobre la salud y medio ambiente	Resistencia
Organoclorados	1950-1970	Efecto residual prolongado, se distribuyen a lo largo de la cadena alimenticia afectando aves y peces. Cancerígenos, provocan esterilidad y defectos de nacimiento.	SI
Organofosfatos	1950-hoy en día	Caracterizados inicialmente como neurotoxinas, altamente tóxicos con un amplio espectro insecticida. Estabilidad moderada en cultivos y medio ambiente. Producen intoxicaciones mortales en personas y animales, algunos producen lesiones en el sistema nervioso después de una constante exposición.	SI
Carbamatos	1960-hoy en día	Baja toxicidad en mamíferos, baja persistencia en el suelo, plantas y el ambiente. Son necesarias varias aplicaciones. Afectan el sistema nervioso central, cancerígenos y provocan efectos adversos sobre la reproducción	SI

† Wheeler, 2002; National Academy of Science, 2000; Maroni et al., 2006

## ***Bacillus thuringiensis*: Características generales y su uso como biopesticida.**

*Bacillus thuringiensis* (Bt) fue descrito por primera vez por Berliner en 1911, cuando aisló una especie de *Bacillus* de la polilla de la harina del mediterráneo, *Anagasta kuehniella*, y la designó en honor a la provincia de Turingia en Alemania dónde encontró la larva infectada. Sin embargo, la bacteria había sido aislada previamente por Ishiwata Shigetane, quien la descubrió como el agente que provocaba la enfermedad de los gusanos de seda, por lo cual la bacteria fue caracterizada inicialmente como un patógeno de insectos (Schenpf et al., 1998; Crickmore, 2005).

El ciclo de vida de Bt consiste de dos fases principales: la fase de crecimiento vegetativo y la fase de esporulación. En la fase de crecimiento, la bacteria se reproduce por bipartición, mientras que en la fase de esporulación se activa un programa de diferenciación debido a la privación de nutrientes como carbono, nitrógeno y fósforo (Soberón y Bravo., 2008). Durante la fase de esporulación, la bacteria sintetiza una inclusión cristalina de naturaleza proteica conformada por proteínas Cry (también denominadas  $\delta$ -endotoxinas) y proteínas Cyt (Pigott y Ellar, 2007). En 1956, T. Angus demostró que las inclusiones cristalinas que se formaban durante el proceso de esporulación eran las responsables de la actividad insecticida de Bt.

Las proteínas Cry (cristal) son tóxicas contra las larvas de distintos ordenes de insectos: lepidópteros (mariposas y polillas), dípteros (moscas y mosquitos) y coleópteros (escarabajos). Aunque también se han reportado toxinas Cry que presentan actividad contra himenópteros (abejas y avispas) (García Robles et al., 2001) y nemátodos (Marroquin et al., 2000; Wei et al., 2003). Por otro lado las proteínas Cyt se encuentran en cepas mosquiticidas y son capaces de sinergizar a las toxinas Cry.

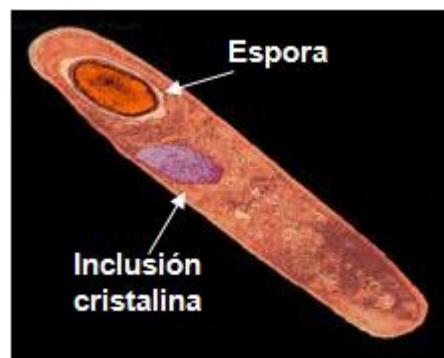


A lo largo de la historia se ha documentado la aplicación segura de Bt con fines de control biológico, la primera producción comercial de un insecticida basado en Bt surgió en Francia en 1938, con el producto Sporeine (Shelton et al., 2002). A principios de la década de 1950 Steinhaus comenzó a experimentar con Bt *ssp. kurstaki*, logrando producir una formulación llamada Thuricide (Steinhaus.,1951). Esta cepa produce las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry2A y se convirtió en la base de productos que eran capaces de competir con los insecticidas químicos en cuanto a desempeño y costo. Hoy en día otras variantes son utilizadas de manera extensiva para el control de larvas de plagas y vectores de enfermedades, lo cual tiene beneficios en la salud y el medio ambiente (Crickmore., 2005). Por ejemplo, la subespecie *israelensis*, produce un cristal compuesto por las proteínas Cry4Ba, Cry4Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa y Cyt2Ba, las cuales son tóxicas contra dípteros (Goldberg et al., 1977), y la subespecie *tenebrionis* (Krieg et al., 1983), produce la toxina activa contra coleópteros Cry3A.

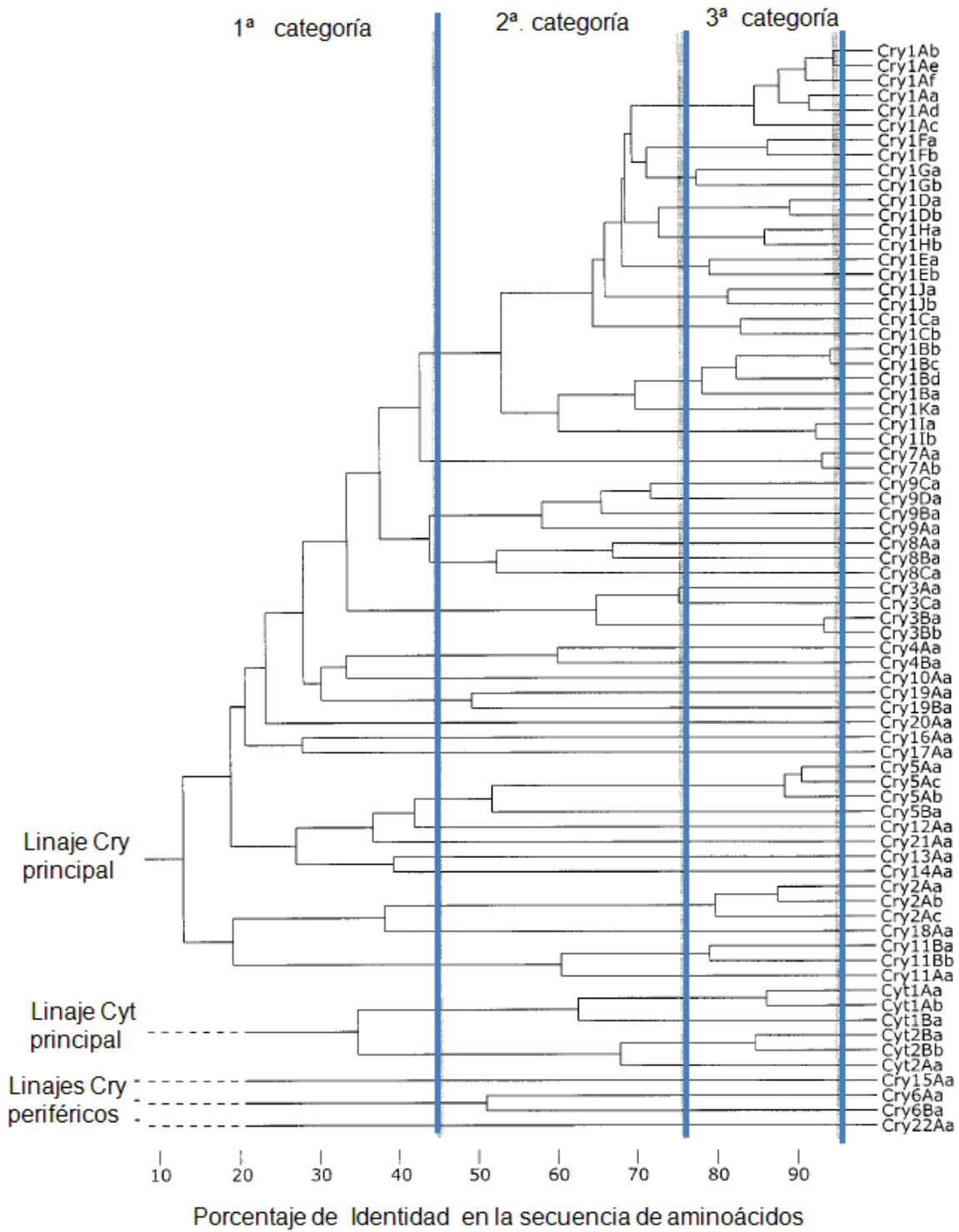
El empleo de Bt se ha incrementado a medida que los insectos plaga han adquirido resistencia contra los insecticidas químicos. Se estima que los aerosoles de Bt generan ganancias de 8 mil millones de dólares anualmente en los Estados Unidos (Jong Yul et al., 2007). A la fecha los genes de Bt que codifican para las proteínas Cry se utilizan en expresión transgénica para proveer de resistencia a distintos cultivos contra plagas (Nicholson 2007; Gatehouse, 2008). De hecho, desde 1996 se comercializan cultivos que expresan toxinas de Bt, estas variedades resistentes a insectos plaga representan el segundo lugar en el uso de cultivos genéticamente modificados, después de los cultivos resistentes a herbicidas (Crickmore., 2005).

## Clasificación de las toxinas Cry

De manera general, las proteínas Cry que conforman el cristal paraesporal (Figura 1) se encuentran codificadas en plásmidos de gran tamaño y se clasifican de acuerdo a la identidad de su secuencia de aminoácidos. A cada proteína se le asigna un nombre compuesto por el término Cry (o Cyt dependiendo del caso) seguido de cuatro categorías jerárquicas que se definen de acuerdo a la posición que ocupa la proteína en el árbol filogenético. La primera categoría es un número arábigo, y a toda proteína que muestra una identidad menor al 45% respecto a las proteínas conocidas se le asigna un nuevo número. La segunda categoría es una letra mayúscula y se le asigna una nueva letra a las proteínas que comparten un porcentaje de identidad mayor a 45 pero menor a 75. La tercera categoría es una letra minúscula y esta define a proteínas que comparten más del 75% de identidad pero menos del 95%. Para poder diferenciar a proteínas que varían solamente en algunos residuos, se asigna una cuarta categoría, que consiste en un número arábigo el cual se asigna a proteínas que presentan una identidad entre el 95% y el 100% (Figura 2) (Crickmore et al, 1998; de Maagd et al., 2001).



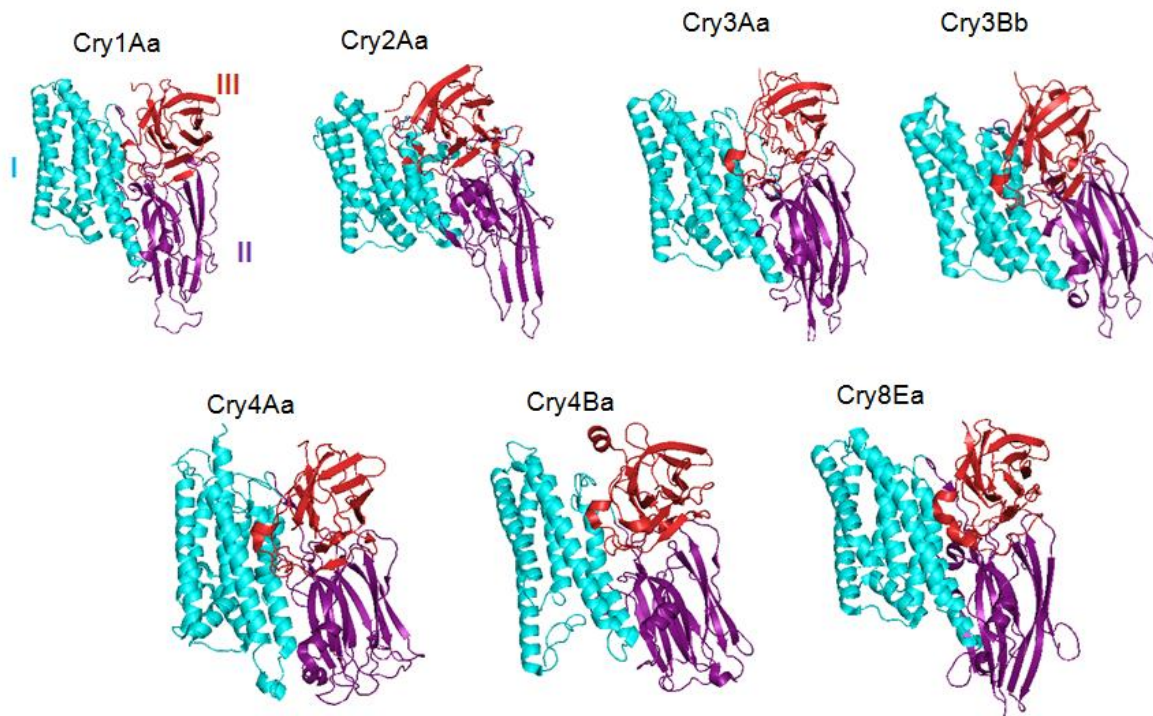
**Figura 1.** Esporangio de *B. thuringiensis*, la inclusión cristalina y la espora se indican con flechas.



**Figura 2.** Filogenia de las dos principales familias génicas de delta-endotoxinas, las líneas verticales denotan las categorías que definen la nomenclatura de estas proteínas (Tomado de Crickmore et al., 1998)

## Estructura y función de las toxinas Cry

Mediante el uso de cristalografía de rayos X se ha logrado determinar la estructura de siete toxinas Cry: Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb1, Cry4Aa, Cry4Ba y Cry8Ea1 (Grochulski et al., 1995; Morse et al., 2001; Li et al., 1991; Galitsky et al., 2001; Boonserm et al., 2005, 2006; Guo et al., 2009). Estas toxinas presentan diferencias en sus secuencias de aminoácidos; sin embargo como se puede apreciar en la Figura 3, la organización estructural se encuentra conservada y todas ellas presentan una topología conformada por tres dominios funcionales (Piggot and Ellar, 2007).



**Figura 3.** Estructuras cristalinas de las toxinas Cry resueltas a la fecha, los dominios I, II y III se muestran en azul, morado y rojo respectivamente. Cry1Aa (PDB ID: 1CIY), Cry2Aa (PDB ID: 1I5P) , Cry3Aa (PDB ID: 1DLC), Cry3Bb (PDB ID: 1JI6), Cry4Aa (PDB ID: 2C9K), Cry4Ba (PDB ID: 1W99) y Cry8Ea (PDB ID: 3EB7)

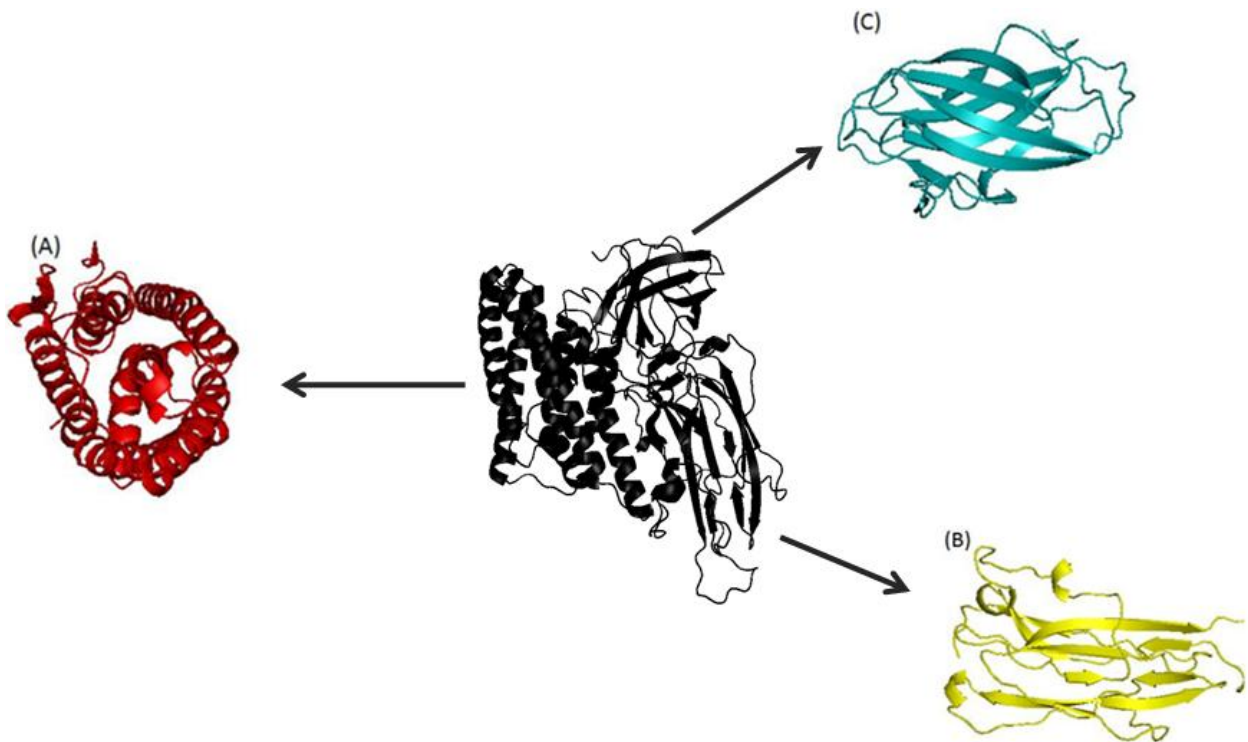
Dado el alto grado de conservación en las estructuras conocidas de las proteínas Cry de tres dominios, se ha propuesto que el modo de acción podría ser similar para las distintas toxinas (Bravo et al., 2007). A diferencia de las toxinas Cry de tres dominios, las toxinas Cyt poseen un solo dominio que comprende dos horquillas  $\alpha$ -hélices rodeadas por una lámina  $\beta$ . A continuación se describen los dominios funcionales de las toxinas Cry.

### **Dominio I**

Comprende la región N-terminal de la proteína y está formado por un ramillete de siete  $\alpha$ -hélices que se encuentran organizadas de manera que 6 de ellas ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$  y  $\alpha 7$ ) rodean a la hélice central de carácter hidrofóbico ( $\alpha 5$ ). Las hélices externas se conforman por aminoácidos cargados o polares que miran hacia el interior, de cara a la hélice central, mientras que aminoácidos hidrofóbicos se orientan hacia el lado opuesto otorgándoles un carácter anfipático (Figura 4 A). La mayoría de las hélices miden más de 30 Å y por lo tanto tienen la capacidad de atravesar una membrana (Bravo et al., 2007; Boonserm et al., 2006). Además, el dominio I presenta una similitud estructural con otras dos toxinas bacterianas formadoras de poro que han sido bien caracterizadas: la toxina de la difteria y la colicina A (Parker and Pattus, 1993). El papel del dominio I en la formación del poro, inserción en membrana y oligomerización ha sido demostrada mediante estudios que involucran diferentes estrategias, como el uso de péptidos sintéticos y de mutagénesis sitio dirigida.

## Dominio II

El dominio II está formado por tres láminas  $\beta$  antiparalelas que se empacan de manera que forman un prisma- $\beta$  (Figura 4 B), cada una de las cuales termina en un asa expuesta al solvente: asas  $\alpha$ 8,1, 2 y 3 (Boonserm et al., 2005, 2006).



**Figura 4.** Dominios funcionales de las toxinas Cry; **(A)** Dominio I conformado por siete  $\alpha$ -helices, **(B)** Dominio II conformado por tres hojas- $\beta$  antiparalelas, **(C)** Dominio III formado por dos hojas- $\beta$  que se estructuran como un emparedado- $\beta$ . Al centro se muestra la estructura de la proteína Cry1Aa (PDB ID: 1CIY).

En cuanto a la estructura, el dominio II es el que presenta la mayor variación entre los miembros de las toxinas Cry, las principales diferencias se observan en las

asas del ápice en las cuales la disimilitud es considerable en cuanto a longitud, secuencia y conformación. Además de esto, la longitud de las láminas  $\beta$  también es variable siendo las toxinas Cry2Aa y Cry4Ba los ejemplos más notables en cuando a la diferencia en longitudes. Dada la variabilidad que presenta este dominio, y las similitudes que tiene el ápice de la toxina con la región determinante de complementariedad de las inmunoglobulinas, se hipotetizó que podría estar jugando un papel en la unión a receptores (Pigott y Ellar, 2007). En el caso de las toxinas de la familia Cry1A esto se comprobó mediante estudios genéticos. Al evaluar los efectos en la toxicidad de cambios sobre residuos de las asas 2 y 3 se logró definir la importancia de algunos de los aminoácidos que las conforman en la actividad insecticida de la proteína Cry1Aa (Smedly and Ellar, 1996). Siguiendo la estrategia de barrido de alaninas Rajamohan y colaboradores identificaron residuos importantes para la toxicidad en las asas 2 y 3 de la toxina Cry1Ab (Rajamohan et al., 1995, 1996). Con base en estas evidencias, se considera que el dominio II es responsable de establecer interacciones importantes con los receptores que se encuentran en la membrana de las células blanco (Pacheco et al., 2009, Arenas et al., 2010), ya que la falta de toxicidad de estas mutantes se ha asociado a la incapacidad de establecer estas interacciones (Gómez et al., 2002; Bravo et al., 2005)

### **Dominio III**

El dominio III corresponde a la región C-terminal y se conforma por dos láminas  $\beta$  antiparelelas (Boonserm et al., 2005, 2006) que se empacan una contra otra formando un emparedado  $\beta$  (Figura 4 C). Ambas láminas están conformadas por 5 hebras, la lámina externa se expone al solvente y comprende las hebras:  $\beta$ 13b,  $\beta$ 16,  $\beta$ 22,  $\beta$ 18 y  $\beta$ 19; mientras que la lámina interna se empaca contra el dominio II y se compone de las hebras:  $\beta$ 20,  $\beta$ 17,  $\beta$ 23,  $\beta$ 13 y  $\beta$ 15, dos asas largas se extienden de un extremo del dominio e interaccionan con el dominio I (Grochulski et al., 1995) Este dominio presenta menor variabilidad estructural que el dominio II y las diferencias que se observan se encuentran en la longitud orientación y

secuencias de las asas (Boonserm et al., 2005). Se han reportado estudios que sugieren que este dominio se encuentra involucrado en la especificidad de las toxinas (de Maagd et al., 1996, 2000; Herrero et al., 2004, Karlova et al., 2005) y en unión a receptores (Bravo et al., 2007, Arenas et al., 2010). En el caso de la toxina Cry1Ab se ha logrado definir que la región  $\beta$ 16 juega un papel en la toxicidad contra *M. sexta* (Ocelotl., 2008).

### **Modo de Acción de las toxinas Cry**

Las proteínas Cry son toxinas formadoras de poro, que sufren una serie de cambios conformacionales que les permiten insertarse en la membrana de las células epiteliales de la microvellosidad media apical del intestino del insecto. Este proceso requiere de receptores, con los cuales la toxina establece interacciones específicas (Bravo et al., 2007).

El mecanismo de acción de estas toxinas, el cual se ha estudiado principalmente en insectos del orden lepidóptera (mariposas en su forma adulta), inicia con la ingestión de las inclusiones cristalinas por la larva susceptible, una vez en el tracto digestivo del insecto ocurren una serie de eventos que a continuación se describen.

**1. Solubilización:** Los cristales proteínicos son solubilizados al encontrarse con las condiciones alcalinas y reductoras del lumen del intestino, liberando a las proteínas Cry en forma de protoxinas, en el caso de las proteínas Cry1 el peso molecular aproximado es de 130 kDa.

**2. Procesamiento proteolítico:** Una vez que se han liberado las protoxinas, estas son procesadas por las proteasas propias del jugo gástrico. Este procesamiento involucra la remoción de un péptido en el extremo N-terminal. En el caso de las toxinas Cry1 dicho péptido consiste de 25 a 30 aminoácidos. De manera similar la extensión del C-terminal es removida, dando lugar a un fragmento resistente a la

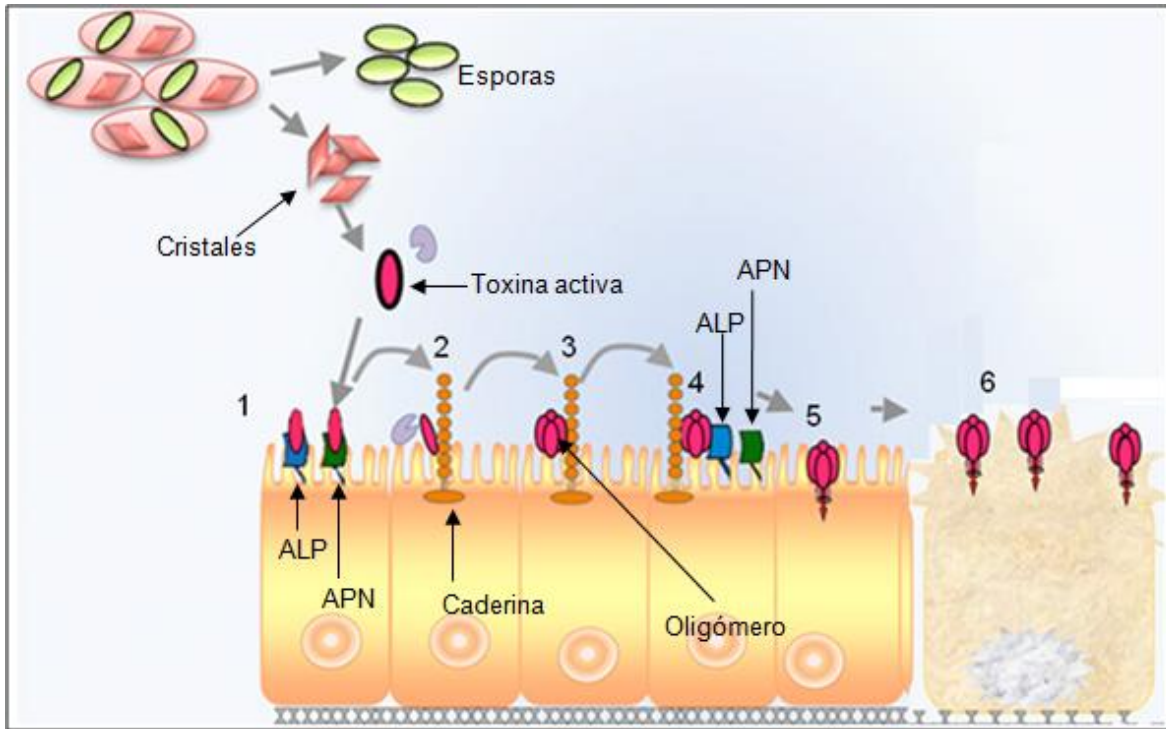


proteólisis y que tiene una masa de aproximadamente 60 kDa, denominado toxina activa (Bravo et al., 2007).

**3. Interacción con los receptores:** Recientemente se ha propuesto que la toxina activa interacciona con baja afinidad con los receptores: fosfatasa alcalina (ALP) y aminopeptidasa-N (APN); los cuales están anclados por glicosilfosfatidil-inositol (GPI) (Figura 5: 1). Posterior a este evento se da una interacción con el receptor caderina (CADR) (Pacheco et al., 2009), lo cual resulta en la eliminación de la hélice  $\alpha$ -1 (Gómez et al., 2002) (Figura 5: 2).

**4. Oligomerización:** El procesamiento de la hélice  $\alpha$ 1 expone residuos hidrofóbicos que facilitan la formación de un pre-poro oligomérico (Gómez et al., 2002) (Figura 5: 3), que se presume está formado por 4 unidades monoméricas.

**5. Interacción del oligómero con receptores anclados por GPI:** Una vez que se ha formado el complejo de pre-poro oligomérico, éste interactúa con los receptores ALP y APN (Figura 5: 4), esta unión promueve su localización en balsas lipídicas favoreciendo su inserción en la membrana, provocando entonces un desbalance osmótico y finalmente la muerte de la célula (Figura 5: 5 y 6) (Bravo et al., 2004).



**Figura 5.** Modo de acción de las toxinas Cry en lepidópteros (para mayores detalles consultar el texto).

### Antecedentes particulares

#### Estudios funcionales sobre el Dominio III de las toxinas Cry.

Los estudios que se han realizado para comprender el papel del dominio III en el mecanismo de acción de las toxinas Cry, no son tan extensos como los dedicados al dominio I o al dominio II, no obstante, en algunos reportes se subraya su importancia e impacto en la especificidad. En la Tabla II se presentan los resultados obtenidos con algunas toxinas Cry1 donde se intercambia el dominio III de toxinas activas con su similar en toxinas de baja o nula actividad y se aprecia que sólo las que contienen el dominio III de las proteínas activas son tóxicas.

**Tabla II.** Dosis letales medias de toxinas Cry parentales y quimeras.

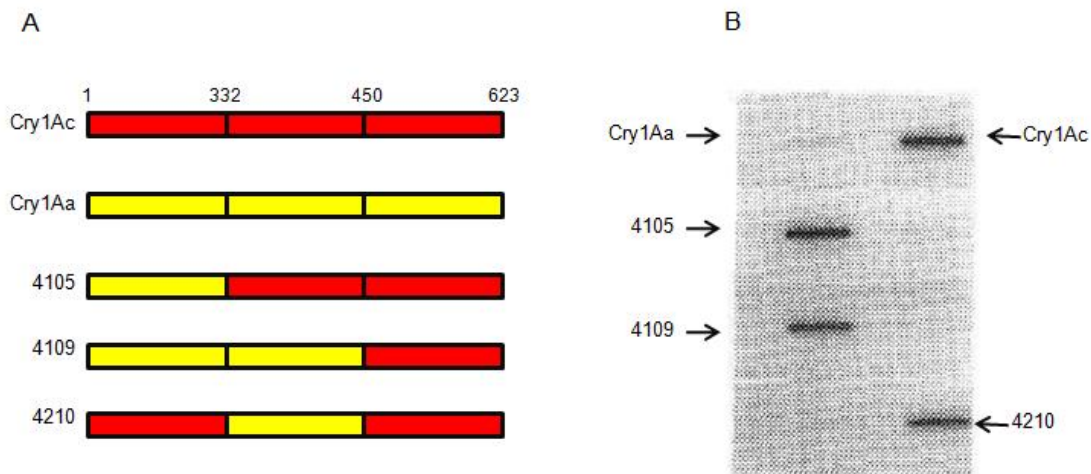
Insecto	Toxina	LC <sub>50</sub>	Referencia
<i>S. exigua</i>	Cry1Ca $\Delta$	11 $\mu\text{g/g}$ dieta	de Maagd <i>et al.</i> , 1996
	Cry1E $\S$	NO TÓXICA	
	G27* (1E/1E/1Ca)	7.37 $\mu\text{g/g}$ dieta	
	Cry1Ab $\S$	>100 $\mu\text{g/g}$ dieta	
	H04* (1Ab/1Ab/1Ca)	1.66 $\mu\text{g/g}$ dieta	
<i>H. virescens</i>	Cry1Ac $\Delta$	22 $\text{ng/cm}^2$	Karlova <i>et al.</i> , 2005
	Cry1Fb $\S$	> 8000 $\text{ng/cm}^2$	
	RK12* (1Fb/1Fb/1Ac)	115 $\text{ng/cm}^2$	
<i>M. sexta</i>	Cry1Ca $\Delta$	155 $\text{ng/cm}^2$	de Maagd <i>et al.</i> , 2000
	Cry1Ba $\S$	>1000 $\text{ng/cm}^2$	
	BBC13 * (1Ba/1Ba/1Ca)	85 $\text{ng/cm}^2$	

$\Delta$  Toxinas que de manera natural presentan actividad contra el insecto indicado.

$\S$  Toxinas que presentan una actividad baja o nula contra el insecto indicado.

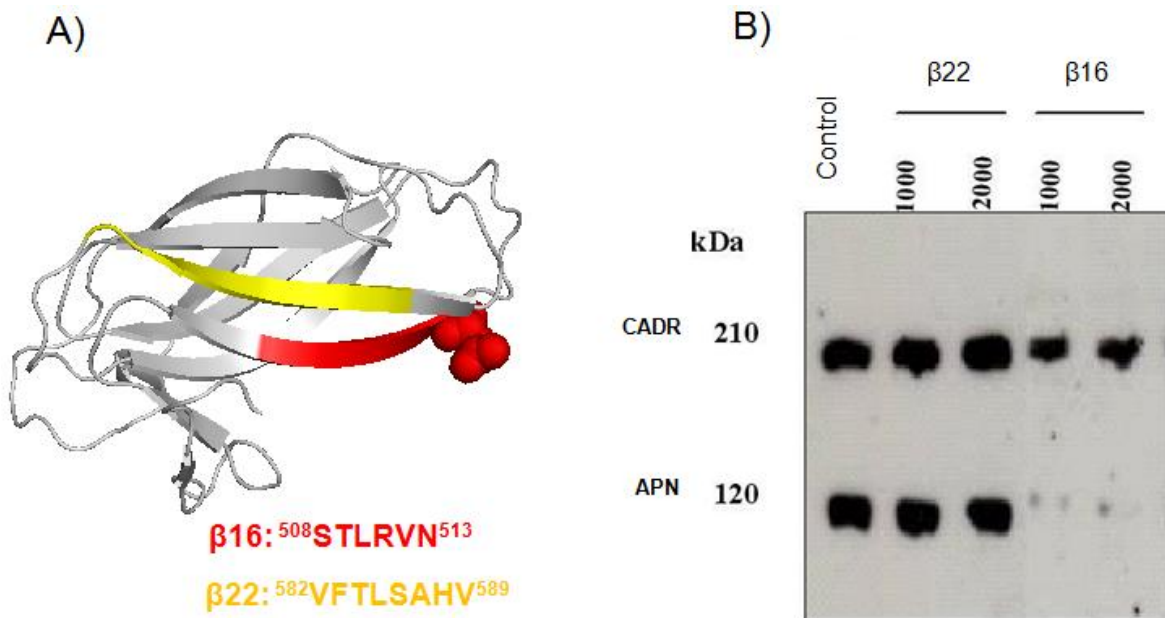
\*Entre paréntesis se muestra el origen del dominio I, dominio II y dominio III respectivamente. i.e. (dominio I/ dominio II/ dominio III).

Además de estos trabajos con toxinas quiméricas, otros reportes indican que el dominio III es importante para la interacción con el receptor APN. Lee y colaboradores analizaron la interacción de construcciones híbridas entre las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac, y notaron que únicamente las proteínas que contienen al dominio III de Cry1Ac unen a la APN de *Lymantria dispar* (Figura 6) (Lee et al., 1995).



**Figura 6.** **A.** Representación esquemática de las toxinas híbridas construidas por Lee et al., el dominio I comprende el residuo 1 al 332, el dominio II del 332 al 450 y el dominio III del 450 al 623. **B.** Unión de APN marcada con  $[^{125}I]$  a las toxinas parentales Cry1Aa y Cry1Ac y a las toxinas híbridas que contienen el dominio III (residuos 450 a 623) de Cry1Ac (4105, 4109 y 4210) (tomado de Lee et al., 1995).

En el 2005, Atsumi y colaboradores identificaron el sitio de unión a la BmAPN1 en la toxina Cry1Aa, las regiones identificadas incluyen los residuos:  $^{508}\text{STLRVN}^{513}$  y  $^{582}\text{VFTLSAHV}^{589}$ , que corresponden a las láminas  $\beta 16$  y  $\beta 22$  respectivamente (Figura 7 A) (Atsumi et al., 2005).



**Figura 7. A)** Estructura tridimensional del dominio III que muestra la localización de las regiones de interacción propuestas por Atsumi et al. (2005). Ambas regiones se encuentran adyacentes en la hoja externa del dominio III, el residuo N514 está representado con esferas. **B)** Ensayo de competencia de unión usando péptidos sintéticos; los números indican el exceso molar de competidor utilizado. El péptido que corresponde a la región  $\beta$ -16 compite la unión de la toxina Cry1Ab al receptor APN de *M. sexta* (tomado de Gómez et al., 2006).

Posteriormente Gómez y colaboradores (2006), analizaron el papel de estas regiones en el contexto de la toxina Cry1Ab. Se sintetizaron los péptidos DIII-1 cuya secuencia es  ${}^{506}\text{GQI}\mathbf{STLRVNITA}^{517}$  y DIII-2 cuya secuencia es  ${}^{583}\mathbf{VFTLSAHVFN}^{592}$  (en negritas se denotan los aminoácidos que corresponden a las regiones  $\beta 16$  y  $\beta 22$  respectivamente), con los cuales se realizaron ensayos de competencia en ligand blot. En estos experimentos se demostró que el péptido que corresponde a la región  $\beta 16$  compite la unión de la toxina Cry1Ab con el

receptor APN (Figura 7 B), y se concluyó que la región  $\beta$ 16 del dominio III de la toxina Cry1Ab participaba en la interacción con este receptor en *M. sexta* (Gómez et al., 2006).

No obstante, estos análisis sólo evaluaron la importancia de las regiones  $\beta$ 16 y  $\beta$ 22 en la interacción *in vitro*, sin validar la relevancia de los residuos que las componen en la toxicidad de las proteínas Cry1A *in vivo*.

### **Mutaciones en el dominio III de toxinas Cry1 afectan la toxicidad.**

Recientemente se han reportado mutaciones en el dominio III de la toxina Cry1Ac que resultan en un incremento en la toxicidad. Mediante evolución dirigida se obtuvo una variante de esta proteína, en la cual el cambio de la treonina en la posición 524 por un residuo de asparagina (T524N) resultó en un incremento de 0.68 veces en la toxicidad contra *S. exigua*. Este residuo se localiza en el cuarto bloque conservado que conforma el asa que une las láminas  $\beta$ 16 y  $\beta$ 17 y que es parte de una región rica en argininas que forma una superficie hidrofóbica con cargas positivas, que se ha propuesto se involucra en la interacción con receptores que contienen cargas negativas. En otro estudio se involucró a un residuo de asparagina en la posición 546. En este caso se obtuvo la variante N546A, cuya toxicidad relativa contra *H. armígera* es de 1.78 respecto a la de la toxina silvestre que es de 1, este residuo se orienta hacia la superficie de la proteína Cry1Ac, ubicándose en la parte superior de una cavidad en la superficie del dominio III, la cual se ha sugerido está involucrado en la interacción con APN a través del reconocimiento del azúcar N-acetilgalactosamina (Tabla III).

**Tabla III. Dosis letal media de mutantes en el dominio III de la toxina Cry1Ac.**

Insecto	Toxina	LC <sub>50</sub> (µg/mL)	Referencia
<i>S. exigua</i>	Cry1Ac WT	14.1 (12.8-15.4)	Shan et al, 2010
	T524N	9.6 (8.4-12.1)	
<i>H. armígera</i>	Cry1Ac WT	2.98 (2.37-3.63)	Xiang et al., 2009
	N546A	1.67 (1.31-2.04)	

Entre paréntesis se muestran los límites de confianza.

De manera similar, mediante el empleo de la mutagénesis se han obtenido mutantes que resultan en una disminución de la toxicidad. Basados en los estudios de Atsumi y Gómez, construimos una serie de mutantes sencillas en las regiones  $\beta 16$  (residuos: <sup>509</sup>STLRVN<sup>514</sup>) y  $\beta 22$  (residuos: <sup>583</sup>VFTLSAHV<sup>590</sup>) del dominio III de la toxina Cry1Ab, en las cuales intercambiamos cada uno de los aminoácidos que las componen por alanina para evaluar su papel *in vivo* en la actividad insecticida contra *M. sexta*. Nuestros resultados indican que el residuo de leucina en la posición 511 de la región  $\beta 16$ , así como el residuo de serina en la posición 587 de la región  $\beta 22$ , son esenciales para la toxicidad de Cry1Ab en el modelo de estudio *M. sexta*, ya que al reemplazar estos aminoácidos por alanina la proteína pierde su actividad insecticida (mutantes L511A y S587A) (Ocelotl, 2008; Arenas et al., 2010).

Al realizar un análisis entre las secuencias de las toxinas Cry1Ca y Cry1Ab se observa que comparten un 65% de identidad y al realizar un alineamiento en el dominio III se advierte que la región  $\beta 16$  se encuentra conservada entre ambas toxinas. Si bien ambas presentan actividad contra *M. sexta*, aún no se ha

delimitado alguna región del dominio III de la toxina Cry1Ca que sea indispensable para la toxicidad. Debido a que previamente descubrimos que la región  $\beta$ 16 es importante para la actividad entomocida de Cry1Ab en contra de *M. sexta*, se sugiere que la región  $\beta$ 16 del dominio III de la proteína Cry1Ca podría estar también involucrada en la toxicidad en contra del lepidóptero *M. sexta*.

Reportes recientes sugieren que residuos de asparagina que se localizan en regiones de interacción, juegan un papel en la actividad entomocida, ya que al mutar estos residuos se pueden obtener variantes cuya toxicidad se ve afectada. En la posición 514 de la región  $\beta$ 16 del dominio III de la toxina Cry1Ab se ubica un residuo de asparagina y nos interesó explorar la posibilidad de realizar mutagénesis a saturación sobre la asparagina 514 de la lámina  $\beta$ 16 de la toxina Cry1Ab, para evaluar si es posible la obtención de mutantes que incrementen la actividad insecticida en contra de *M. sexta*.

Si somos capaces de determinar la(s) región(es) de la toxina Cry1Ca que se involucran en la toxicidad contra *M. sexta* y comprender sus funciones, eventualmente podremos diseñar toxinas que nos permitan contender con fenotipos de resistencia o que nos permitan obtener variantes más tóxicas contra insectos de interés.



**Hipótesis:**

La región conservada  $\beta$ 16 del dominio III de la toxina Cry1Ca es importante para la toxicidad *in vivo* en *M. sexta*.

**Objetivo General:**

Evaluar el papel de la región  $\beta$ 16 del dominio III de la  $\delta$ -endotoxina Cry1Ca en la actividad insecticida contra *M. sexta*.

**Objetivos Particulares:**

Analizar los efectos de mutaciones sencillas en la región  $\beta$  16 del dominio III de la toxina Cry1Ca, cambiando cada uno de los residuos por alanina, en la función de esta proteína.

Caracterizar la capacidad de unión de las mutantes generadas a vesículas de la microvellosidad media apical de intestinos de *M. sexta*.

Obtener una librería de mutantes sobre la asparagina 514 de la región  $\beta$  16 del dominio III de la toxina Cry1Ab y evaluar los efectos sobre la toxicidad contra *M. sexta*.

## **Materiales y Métodos.**

### **Cepas utilizadas.**

*Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 $\alpha$  Genotipo: F- $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$  (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1  $\lambda^-$*  (Invitrogen).

*E. coli* SCS110, deficiente en dos sistemas de metilasas (Dam y Dcm); Genotipo: *rpsL* (Strr) *thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44  $\Delta$ (lac-proAB) [F' *traD36 proAB lacIqZ* $\Delta$ M15 (Stratagene).*

Cepa de *B. thuringiensis* 407 Cry $^-$  acristalífera que carece de capacidad para sintetizar toxinas debido a la pérdida de los plasmidos Cry (Agaisse y Lereclus,1995).

### **Fosforilación de oligonucleótidos mutagénicos.**

Los oligonucleótidos mutagénicos fueron sintetizados por Invitrogen® (Estados Unidos). Estos fueron diseñados a partir de la secuencia del gen de la protoxina cristalina entomocida de *B. thuringiensis* Cry1Ca (Acceso GenBank: AY955268), los cambios introducidos y la secuencia de los oligonucleótidos se muestran en la Tabla IV. Para la construcción las mutantes sobre la asparagina 514 (N514) de la toxina Cry1Ab se utilizó un oligonucleótido degenerado que permite obtener cambios al azar sobre un codón seleccionado (Steffens and Williams, 2007), buscando que la mayoría de los 20 aminoácidos posibles sean introducidos sobre el residuo de interés. Como templado se utilizó el gen de la protoxina Cry1Ab (Acceso GenBank: M13898). La secuencia del oligonucleótido diseñado para la mutagénesis a saturación se denominó oligo N514-Ab: 5'-C AAC CTT AAG AGT A **NNS** ATT ACT GCA CCA TTA TC-3', dónde N representa cualquiera de las cuatro bases nitrogenadas y S denota G o C.

Los oligonucleótidos liofilizados fueron resuspendidos en un volumen de 100 µL de agua Mili-Q y se tomaron 300 picomoles de cada oligonucleótido (1 µL), los cuales se añadieron a la mezcla de reacción cuya composición fué: 5µL de amortiguador de cinasa (100 mM de ATP) 10X, 1 µL de enzima PNK, 43 µL de agua Mili-Q para obtener un volumen final de 50 µL. Los componentes de la reacción se mezclaron suavemente con la pipeta y se incubó a 37°C durante 30 minutos y posteriormente se incubó durante 30 minutos adicionales a 68°C para inactivar la enzima. Este paso de fosforilación es requerido para proveer a la ligasa de un grupo fosfato en el extremo 5'. Este grupo es necesario para la ligación.

**Tabla IV.** Oligonucleótidos para la mutagénesis de la región β16 de la toxina Cry1Ca.

Oligonucleotido	Secuencia
V505A	5'-ACC TTT GGT GAT TTT <b>GCA</b> TCT CTA CAA GTC AAT-3'
S506A	5'-TTT GGT GAT TTT GTA <b>GCT</b> CTA CAA GTC AAT ATT-3'
L507A	5'-GGT GAT TTT GTA TCT <b>GCA</b> CAA GTC AAT ATT AAT-3'
Q508A	5'-GAT TTT GTA TCT CTA <b>GCA</b> GTC AAT ATT AAT TCA-3'
V509A	5'-TTT GTA TCT CTA CAA <b>GCC</b> AAT ATT AAT TCA CCA-3'
N510A	5'-GTA TCT CTA CAA GTC <b>GCT</b> ATT AAT TCA CCA ATT-3'
S590A	5'-GAT ATA ATT GGG ATA <b>GCT</b> GAA CAA CCT CTA TTT G-3'

### **Mutagénesis sitio dirigida.**

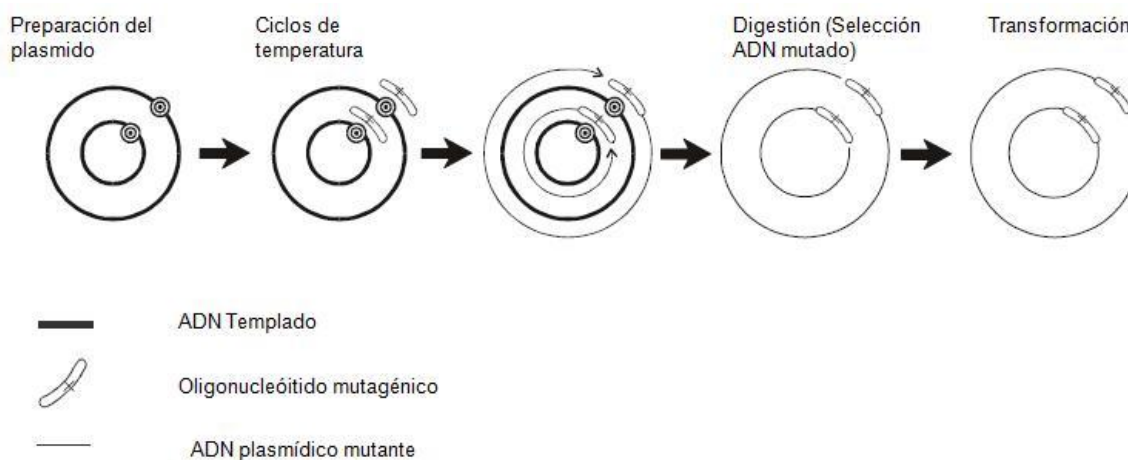
Para la construcción de las mutantes sobre la región  $\beta$ 16 del dominio III de Cry1Ca y las librería de mutantes a saturación sobre la N514 de Cry1Ab, se utilizó el paquete comercial Quickchange® Multi-site Directed Mutagenesis Kit de Stratagene (Agilent Technologies, Estados Unidos), siguiendo las especificaciones del fabricante.

El principio en el cual se basa esta técnica de mutagénesis es el empleo de un plásmido metilado como templado para la PCR. Se utilizan los oligos complementarios al templado que contienen las mutaciones que se desean introducir. Una vez que finaliza la reacción de PCR, se tendrá una mezcla de una cadena metilada y otra sin metilar. Para eliminar el ADN parental metilado se realiza una digestión con la endonucleasa de restricción *DpnI*; de esa manera sólo se selecciona el ADN que contiene la mutación de interés, una vez que se obtuvieron los productos de PCR, se adicionó 1  $\mu$ L de la enzima *DpnI* (10u/ $\mu$ L) directamente a cada reacción de amplificación. Después de esto las mezclas fueron centrifugadas por 30 segundos y se incubaron a 37°C durante una hora para digerir la cadena parental, posterior a la digestión estos productos fueron transformados en la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* (Figura 8). El programa de PCR utilizado se muestra en la tabla V.

### **Preparación y transformación de células electrocompetentes DH5 $\alpha$ de *E. coli*.**

Se inocularon 10 mL de medio YENB con una colonia de la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* y se dejó crecer durante 12 horas con agitación a 37°C. Posteriormente se tomaron 5 mL de precultivo para inocular 250 mL de medio YENB y las células se crecieron con agitación a 37°C hasta que se alcanzó una D.O.<sub>600</sub> de 0.5. Después el matraz fue enfriado en hielo durante 5 minutos y las células fueron cosechadas centrifugando a 4000 g durante 10 minutos. El sobrenadante fue desechado y la pastilla se lavó con 100 mL de agua estéril fría y se centrifugó nuevamente a 4000 g durante 10 minutos. El sobrenadante fue desechado. Este último paso se repitió

una vez más y después las células fueron resuspendidas en 20 mL de glicerol al 10%, se centrifugaron a 4000 g durante 10 minutos y finalmente se resuspendieron en un volumen de 3 mL de glicerol al 10% frío. Se alicuotaron 40  $\mu$ L de células en tubos eppendorf de 0.5 mL y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.



**Figura 8.** Esquema general de la estrategia de mutagénesis empleada en este estudio.

**Tabla V.** Condiciones del programa utilizado en la PCR mutagénica.

No. De Ciclos	Temperatura (C*)	Tiempo (minutos)
1	94	3
35	94	1
	55	1
	65	15
1	65	10

Para la transformación de las células, los productos de PCR digeridos fueron purificados con el paquete comercial MinElute PCR purification Kit de Qiagen®, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificados se tomaron 2  $\mu$ L de ADN, los cuales fueron añadidos a una alícuota de 40  $\mu$ L de células electrocompetentes DH5 $\alpha$  de *E. coli*. El ADN y las células fueron mezclados suavemente mediante pipeteo evitando la formación de burbujas de aire. Esta mezcla se transfirió a celdas de 0.1 cm (BioRad) pre-enfriadas y se aplicó un choque eléctrico de 2.5 voltios a 25 $\mu$ F de capacitancia y 200  $\Omega$  de resistencia. Inmediatamente después del choque se agregó 1 mL de medio SOB a las células y estas fueron transferidas a tubos eppendorf estériles de 1.5 mL. Para su recuperación las células se incubaron a 37°C con agitación durante 1h. Transcurrido este tiempo se tomaron 200  $\mu$ L de células recuperadas que se platearon en cajas de medio sólido selectivo LB-ampicilina (200 $\mu$ g/mL) y se incubaron a 37°C durante 12 horas. Posteriormente se picaron colonias candidatas de cada una de las mutantes las cuales se crecieron en 5 mL de medio LB-ampicilina (100 $\mu$ g/mL) líquido a 37°C durante 12 horas. Finalmente, se purificó el ADN plasmídico para confirmar la presencia de las mutaciones mediante secuenciación.

### **Secuenciación de ADN.**

Las secuencias fueron determinadas en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología- UNAM, en un secuenciador automático de DNA de 16 capilares (Applied Biosystems, modelo 3130 XL, Estados Unidos), capaz de dar lecturas de aproximadamente 900 bases.

## **Preparación y transformación de células competentes de Ca<sup>2+</sup> SCS110 de *E. coli*.**

Se utilizó la cepa SCS110 para obtener ADN plasmídico sin metilar, el cual se utilizó para la transformación de *B. thuringiensis*. Las células competentes de Ca<sup>2+</sup> se prepararon como se describe a continuación. Se inocularon 5 mL de medio LB líquido con una colonia de la cepa SCS110 y este se incubó durante 12 h a 37°C con agitación. Posteriormente se tomaron 2 mL del precultivo para inocular 100 mL de medio LB líquido, el cual fue incubado a 37°C con agitación hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de 0.6, una vez que se alcanzó la densidad óptica deseada el matraz fue colocado en hielo durante 5 minutos y las células fueron recuperadas mediante centrifugación a 3,000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante fue desechado y las células fueron resuspendidas en un volumen de 10 mL de Ca Cl<sub>2</sub> 100 mM frío y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Transcurrido el tiempo de incubación las células fueron centrifugadas a 3,000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se desechó y la pastilla obtenida se resuspendió en un volumen final de 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM más 180 µL de DMSO. Se prepararon alícuotas de 200 µL las cuales se colocaron en tubos eppendorf estériles de 1.5 mL. Las células se utilizaron inmediatamente o se mantuvieron a -70°C hasta su uso.

Para la transformación, las células fueron descongeladas en hielo y se les añadió un volumen de 5 µL de ADN de cada mutante, el cual se mezcló cuidadosamente mediante pipeteo, la mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos, inmediatamente después de que transcurrió el tiempo se dio un choque de calor a 42°C durante 2 minutos. Después las células fueron incubadas en hielo durante 5 minutos y se les añadió un volumen de 800 µL de medio LB. Las células se recuperaron mediante incubación a 37°C con agitación durante una hora. Se tomaron 200 µL de las células recuperadas y se platearon en medio selectivo sólido LB-ampicilina (200 µg/mL) y se incubaron a 37°C durante 12 horas. Se tomó una colonia de cada mutante para inocular 10 mL de medio selectivo líquido

LB-ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron a 37°C durante 12 horas con agitación. Finalmente se procedió a purificar el ADN plasmídico de cada una de las mutantes.

### **Preparación y transformación de células vegetativas de la cepa 407 Cry<sup>-</sup> de *B. thuringiensis*.**

Se estrío la cepa 407 Cry<sup>-</sup> en una caja de petri que contenía medio sólido LB sin antibiótico, y se incubó a 30°C durante 12 horas. A partir de esta caja se tomó una pequeña muestra la cual se extendió sobre una caja de medio sólido LB sin antibiótico fresca y se incubó a 30°C hasta que se observaron colonias transparentes (aproximadamente 3 horas). La totalidad de las células contenidas en la caja fueron recuperadas y resuspendidas en 500 µL de medio BHI, después fueron homogenizadas con ayuda de la pipeta. Se procedió a inocular un volumen de 100 mL de medio BHI, el cultivo se dejó crecer a 30°C con agitación hasta que alcanzó una D.O.<sub>600</sub> de 0.6. En este punto las células se recuperaron mediante centrifugación a 5,000 rpm durante 5 minutos para eliminar el medio de cultivo. El paquete celular fue resuspendido en 50 mL de solución EB fría. Nuevamente las células fueron centrifugadas a 5,000 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en un volumen final de 3 mL de solución EB y se prepararon alícuotas de 300 µL, las cuales fueron utilizadas inmediatamente después de su preparación.

Para la transformación se tomó una alícuota de 300 µL de células y se les añadió un volumen de 10 µL de ADN, el cual se mezcló cuidadosamente con ayuda de la pipeta en condiciones de esterilidad. Se incubó la mezcla ADN-células en hielo durante 5 minutos, posteriormente se transfirió a celdas de 0.4 cm pre-enfriadas y se aplicó un choque de 2.5 V a 25 µF de capacitancia y 1000 Ω de resistencia. Las células electroporadas se incubaron en hielo durante 5 minutos adicionales y transcurrido el tiempo se les añadieron 700 µL de medio BHI, se transfirieron a tubos falcon estériles de 15 mL y se incubaron a 30°C con agitación durante una



hora para su recuperación. Se tomó un volumen de 250  $\mu$ L de células recuperadas y se plateó en medio selectivo sólido LB-eritromicina (10  $\mu$ g/mL). Las cajas se incubaron a 30°C durante 12 horas y se tomaron 4 colonias candidatas de cada mutante para verificar la producción de los cristales de las proteínas.

### **Producción y purificación de cristales.**

Las cepas que expresan las toxinas Cry1Ca y Cry1Ab silvestres, así como de cada una de las mutantes generadas, se sembraron en medio sólido LB-eritromicina (10  $\mu$ g/mL) y se crecieron durante 12 horas a 30°C. A partir de estas cajas las células fueron cosechadas en su totalidad y con ellas se inocularon 50 mL de medio de esporulación líquido HCT, complementado con antibiótico de selección eritromicina (10 $\mu$ g/mL). El crecimiento de estos cultivos se realizó a 30°C con agitación durante 72 horas, tiempo aproximado en el cual se completa la esporulación. Una vez que se pudieron observar al microscopio los cristales, los cultivos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 minutos para recuperar la pastilla que contiene la mezcla de esporas-cristales. Posteriormente la pastilla fue lavada 3 veces con solución de lavado. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos entre cada lavado. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla se lavó 3 veces más con una solución de PMSF 1 mM, centrifugando a 10,000 rpm durante 15 minutos.

Los cristales se purificaron utilizando un gradiente discontinuo de soluciones de sacarosa de 84%, 79%, 72% y 67% cada una de ellas complementada con 2 mL de Tris-HCl 1 M pH 8, 80  $\mu$ L de NaCl 5 M y 400  $\mu$ L de Tritón X-100 al 1%. Las soluciones de mayor concentración se colocaron en el fondo del tubo y por último la muestra de esporas-cristales previamente resuspendida en amortiguador TTN y sonicada con 5 pulsos de 50 segundos a 20 watts, con un minuto de descanso entre pulsos. Los gradientes fueron centrifugados a 23, 000 rpm a una temperatura de 15°C durante 30 minutos en una ultracentrifuga L-80 (Beckman). Las fracciones resultantes fueron colectadas, observadas al microscopio y

aquellas en las que se detectó la presencia de los cristales fueron lavadas tres veces con agua Mili-Q más PMSF 1 mM, esto con la finalidad de eliminar el exceso de sacarosa. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos entre cada lavado. Finalmente los cristales fueron resuspendidos en 3 mL de PMSF 1 mM y se almacenaron a 4°C.

### **Cuantificación de Proteína.**

La cuantificación de proteína se realizó mediante el método de Bradford utilizando una curva estándar preparada con BSA. Para obtener la concentración de proteínas en muestras desconocidas se tomó un volumen de 1 µL de cada una de ellas y se llevó a un volumen final de 800 µL con agua; finalmente se añadieron 200 µL de reactivo de Bradford 5X. Las muestras se incubaron durante 5 minutos y posteriormente la absorbancia de las muestras fue medida a 595 nm.

### **Solubilización y tripsinación de toxinas**

La solubilización se llevó a cabo en un amortiguador de bicarbonatos 100 mM, con un pH de 10.5; como agente reductor se añadió β-mercaptoetanol a una concentración final de 0.02%. Se tomaron 500 µL de los cristales purificados y se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 mL; las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante fue desechado. Las pastillas fueron resuspendidas en 1 mL de buffer de solubilización con ayuda de la pipeta y posteriormente fueron incubadas a 37°C con 800 rpm de agitación durante 1 h en un Thermomixer compact (eppendorf). Transcurrido el tiempo de incubación las muestras fueron centrifugadas nuevamente como se explicó con anterioridad, y se separó la fracción soluble que contiene la protoxina de la pastilla. La protoxina fue almacenada a 4°C hasta su uso.

El procesamiento proteolítico se realiza in vitro; primeramente se ajusta el pH a 8.5 mediante la adición de ¼ parte del volumen en el cual se encuentran las

protoxinas de Tris-HCl 1M pH 8, se añadió tripsina (Sigma-Aldrich) en una relación 1:30 (m/m) a las protoxinas; la reacción fue incubada a 37°C durante una hora. Posteriormente la reacción se detuvo al adicionar el inhibidor de proteasas PMSF a una concentración final de 1 mM. Posterior a la digestión las muestras se centrifugaron a 90,000 rpm en una ultracentrífuga de mesa Optima Max® (Beckman Coulter) para eliminar productos de precipitación de la digestión, Finalmente los sobrenadantes que contienen a la toxina activa fueron recuperados, y almacenados a 4°C hasta su uso. El procesamiento de las proteínas se visualizó en geles de acrilamida al 10%, los cuales fueron teñidos con azul de Coomasie.

### **Bioensayos de toxicidad.**

Los bioensayos de toxicidad se realizaron en cajas de 24 pozos (Corning) con dieta artificial en cada pozo. Se prepararon diluciones de dosis crecientes de las toxinas Cry1Ca y Cry1Ab silvestres, así como de cada una de las mutantes generadas en agua Mili-Q estéril. Cada pozo se contaminó con 35 µL de la dilución de toxina a probar. Posterior a la aplicación de la dosis sobre la superficie de la dieta, las cajas se dejaron secar. Cuando las cajas se secaron se colocó una larva neonata de *M. sexta* por pozo (24 larvas por caja). Las cajas se mantuvieron durante 7 días a temperatura ambiente con un ciclo de 12h de luz y 12h de oscuridad. Posteriormente se calculó el porcentaje de mortalidad comparando con el control negativo que es sólo agua Mili-Q. Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces.

### **Cálculo de la dosis letal media (LC<sub>50</sub>)**

Para la estimación de la LC<sub>50</sub> se realizaron bioensayos con dosis crecientes de las proteínas Cry1Ca, Cry1Ab y de sus respectivas mutantes. Se utilizaron 5 dosis: 5, 10, 25, 50 y 250 ng/cm<sup>2</sup>. En la dosis más baja se espera el menor porcentaje de mortalidad posible, mientras que en la dosis más alta se espera el mayor

porcentaje de mortalidad posible. Los bioensayos se realizan como se describió en la sección anterior y al finalizar los datos se analizan mediante el método de Probit con el software homónimo. El análisis de Probit es una regresión que se utiliza para analizar variables de respuesta binomial (e.g. muerte/ supervivencia). Este análisis transforma la curva dosis-respuesta de una sigmoide a una línea recta, al ajustar los datos a una línea recta se puede comparar la relación entre la variable de respuesta binomial (variable dependiente) y la variable independiente (concentración de toxina). Una vez que se obtiene la regresión se puede determinar la LC50 mediante análisis de máxima verosimilitud o al comparar los porcentajes de mortalidad con las tablas de probits definida por Finney (1952).

### **Purificación de Vesículas de la Microvellosidad Media Apical (VMMA's) del Intestino de *M. sexta*.**

Se disectaron larvas del tercer estadio de desarrollo de *M. sexta* para extraer el intestino medio. Las larvas se mantuvieron en hielo para su disección. Primeramente se fijaron los extremos de la larva a una base de disección, se realizó un corte longitudinal para exponer el intestino, la porción media fue extraída cuidadosamente y se eliminó el bolo alimenticio y la membrana peritrófica. El tejido se lavó exhaustivamente en un amortiguador de disección y se almacenó a -70°C hasta su uso.

Para la preparación de las vesículas:

- Se tomaron 3 gramos de tejido intestinal y se descongelaron en hielo.
- Se colocó el tejido en un tubo de vidrio estéril que contenía 30 ml de solución para preparación de VMMA's.
- Se disgregó el tejido con un émbolo estéril montado en un homogenizador Black & Decker U-114 tipo FV dando 9 golpes a 2,250 rpm.

- Se agregó un volumen de 30 ml de  $MgCl_2$  24 mM al tubo y se cubrió la boca de éste con parafilm; se mezcló suavemente mediante inversión y la muestra se incubó en hielo durante 15 minutos.
- Se centrifugó a 4,500 rpm por 15 minutos a 4°C en un rotor de ángulo fijo JA-20 (Beckman) utilizando una centrífuga J2-HS (Beckman). La pastilla fue descartada y el sobrenadante fue transferido a otro tubo estéril.
- Se centrifugó a 16,000 rpm durante 30 minutos a 4°C usando el equipo antes descrito. El sobrenadante fue desechado y la pastilla resultante fué resuspendida en 15 mL de solución para preparación de VMMA's más 15 mL de  $MgCl_2$  24 mM.
- Se repitieron los dos pasos de centrifugación anteriores para obtener una segunda pastilla al centrifugar a 16,000 rpm, la cual se resuspendió en solución de preparación de VMMA's diluida con agua estéril 1:1 fría. Se dieron 3 golpes adicionales a 2,250 rpm. Se determinó el enriquecimiento en las actividades de APN y ALP. Las vesículas fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

La concentración de proteína en las vesículas se determinó mediante el método de Lowry haciendo uso del paquete comercial Bio-Rad DC Protein Assay, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, utilizando una curva estándar de BSA.

### **Marcaje de toxinas con biotina.**

Se tomó una concentración conocida de toxina soluble y fue mezclada con éster de biotina (Amersham) en una relación 0.5 mg de proteína/20  $\mu$ L de reactivo. La mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. El éster de biotina reacciona con los residuos de lisina y con el N-terminal de la proteína. Para separar la toxina marcada de la biotina libre se utilizaron columnas con 1 ml de

Sephadex G25 (Sigma) en PBS 1X, las cuales se lavaron con aproximadamente 20 ml de PBS 1X y fueron centrifugadas por 2 minutos a 2,000 rpm para eliminar el exceso de PBS. Se colocaron 200  $\mu$ L de la toxina incubada en la columna, y se centrifugó durante 2 minutos a 2,000 rpm para separar la toxina marcada de la biotina libre. Se cuantificó la proteína por el método de Bradford y la marca se verificó por western blot.

Las toxinas marcadas se corrieron en un gel de acrilamida desnaturalizante al 9%. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (ECL-Amersham Pharmacia Biotech) por 1 h a 350 mA.

La transferencia se verificó tiñendo la membrana de nitrocelulosa con rojo de Ponceau 0.5% en ácido acético 2%. Después de eliminar el exceso de colorante con agua corriente, se realizaron los siguientes lavados: con PBS 1X por 10 minutos, con 40 ml de PBS 1X Tween 20 2% durante 20 minutos, dos lavados con 30 ml de PBS 1X Tween 0.1% (15 minutos por lavado) y posteriormente la membrana se incubó con estreptavidina acoplada a peroxidasa (Amersham Life sciences) 1:30,000 v/v en Tween-20 0.1% -PBS 1X. Se lavó dos veces con Tween 20 al 0.1% en PBS 1X durante 10 minutos cada uno y dos veces más con PBS 1X durante 5 minutos. Una vez que se eliminó el exceso de estreptavidina con los lavados, la membrana fue incubada con Visualizer™ Spray & Glow™ ECL Western Blotting System (Millipore), con agitación constante durante un minuto y la señal se reveló en películas para quimioluminiscencia (Amersham Pharmacia Biotech).

### **Ensayo de unión de toxinas a VMMA's.**

Se incubaron 10  $\mu$ g de VMMA's de *M. sexta* con 20 nM de la toxina silvestre o de las mutantes marcadas con biotina en un volumen final de 100  $\mu$ L de amortiguador de unión. La mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente al término de la cual se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 10 minutos. Se realizaron dos lavados con 100  $\mu$ L de amortiguador de unión, la pastilla fue

resuspendida en 15  $\mu$ L de PBS más mezcla lítica 1X y se separaron las proteínas en un gel desnaturizante al 9% para ser transferidas a la membrana de nitrocelulosa. Después de la transferencia se procedió de la misma forma descrita previamente.

### **Modelado molecular.**

Para la construcción de los modelos tridimensionales de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ca se utilizaron los siguientes programas: el software en línea Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), SWISS MODEL y Swiss-Pdb Viewer Versión 4.0. Se realizó un alineamiento múltiple utilizando como templatado la secuencia de la toxina Cry1Aa en el programa Clustal W, éste produce alineamientos biológicamente significativos de secuencias divergentes. Calcula la mejor coincidencia para las secuencias seleccionadas de manera que se evidencian identidades, similitudes y diferencias.

Los modelos de las estructuras de las proteínas Cry1Ab y Cry1Ca se construyeron en SWISS MODEL utilizando el “modo optimizar proyecto” en conjunción con Swiss-Pdb Viewer. La secuencia de las proteínas blanco (Cry1Ab y Cry1Ca) se alineó con el templatado (Cry1Aa, PDB ID: 1CIY) en Swiss-Pdb Viewer de acuerdo al alineamiento producido en Clustal W. Los residuos que no se alinearon en el N- y C-terminal de las proteínas blanco, fueron removidos antes de someterse al programa SWISS-MODEL (Liu y Dean., 2006).

## Soluciones y Medios de Cultivo.

Soluciones			
Nombre	Composición		Comentarios
Cloruro de Calcio	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	100 mM	Esterilizar
Amortiguador EB	Sacarosa	0.625 M	Esterilizar
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM	
Solución I  (para complementar el medio HCT)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68 g / L	Esterilizar
Solución II  (para complementar el medio HCT)	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	12.3 g/L	Esterilizar
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.169 g/L	
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.4 g/L	
Solución III  (para complementar el medio HCT)	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2 g/L	Esterilizar
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100 ml/L	
Solución IV  (para complementar el medio HCT)	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	14.7 g/L	Esterilizar



Amortiguador de Corrida 10X	Tris Glicina SDS al 10%	30 g/L 14.4g/L 10 mL/L	Filtrar
Amortiguador de Transferencia	Tris Glicina Metanol	30 g/L 14.4g/L 200mL/L	Filtrar
Amortiguador de Carbonatos 5X	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> NaHCO <sub>3</sub>	5.5 g/100 mL 4.2g/100 mL	Las soluciones se preparan por separado. Se toman 20 ml de la solución de Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub> y se le agregan aproximadamente 80 ml de la solución de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> hasta llegar a un pH de 10.5
Amortiguador de Disección	Manitol Tris EGTA DTT PMSF	300 mM 17 mM 5 mM 2 mM 0.1 mM	Ajustar el pH a 7.4 con KOH

Amortiguador de Unión	BSA Tween 20  en PBS 1X	0.1% 0.1%,	
Solución de preparación de VMMA's	Manitol Tris EGTA DTT EDTA Leupeptina Pepstatina Neomicina PMSF	300 mM 17 mM 5 mM 2 mM 1 mM 10 µL(1 mg/mL) 10 µL(1 mg/mL) 6 µL(12 mg/mL) 1mM	Ajustar el pH a 7.4 con KOH
Solución de Lavado de Cristales	NaCl EDTA,	0.5 M 0.01 M	Ajustar el pH a 8.0
Amortiguador TTN	Tris Tritón X-100 NaCl	20 mM 0.01% 300 mM	Almacenar a 4°C.
Medios para Bacterias			
Nombre	Composición		Comentarios
LB	Bacto Triptona Extracto de levadura	10 g/L 5 g/L	Ajustar el pH a 7 con NaOH y esterilizar.

	NaCl	10 g/L	
LBagar	Medio LB pH 7.0 Agar	1L 15 g	Esterilizar. Dejar enfriar hasta ~50°C y añadir, si procede, el antibiótico de selección. Distribuir en cajas petri y dejar solidificar. Conservar a 4°C
SOB	Bacto Triptona Extracto de levadura NaCl KCl	20 g/L 5 g/L 0.5 g/L 0.186 g/L	Se ajusta el pH a 7.0 con NaOH y esterilizar. Si se utiliza el medio SOB agregar 10 ml/L de una solución de MgCl <sub>2</sub> 2M y 10 ml de Glucosa 1M ambas previamente esterilizadas.
BHI	Infusión cerebro-corazón	37 g/L	Esterilizar.
HCT	Bacto Triptona Casa-amino-acidos	5 g/L 2 g/L	Ajustar el pH a 7.25 con KOH y esterilizar. Antes de usar complementar con 50 ml de la Sol I, 1 ml de la Sol II, 10 ml de la Sol III, 10 ml de la Sol IV y 30 ml de Glucosa al 10% por cada litro.
YENB	Extracto de Levadura Caldo Nutritivo	7.5 g/L 8.0 g/L	Ajustar pH a 7.0 con NaOH, y esterilizar.

### Composición de geles de poliacrilamida para electroforesis en condiciones desnaturizantes.

Reactivo	Gel Separador (5 mL)	Gel concentrador (2 mL)
H <sub>2</sub> O Mili-Q	2.0 mL	1.4 mL
Tris-HCl 1 M pH 8.8	1.3 mL	-----
Tris-HCl 1.5 M pH 6.8	-----	250 µL
Acrilamida/Bis acrilamida al 30%	1.7 mL	0.33 µL
SDS al 10%	50 µL	20 µL
APS al 10%	50 µL	20 µL
TEMED	4 µL	2 µL

### Composición y preparación de la dieta artificial de *Manduca sexta*

Se licuaron 20 g de agar con 500 mL de agua destilada a punto de ebullición, el agar se incorpora mediante calentamiento en un horno de microondas. En otros 500 mL de agua destilado a punto de ebullición se incorporan 80 g de germen de trigo, 36 g de caseinato de caseína, 23 g de sacarosa, 16 g de levadura, 12 g de sales wesson, 2 g de ácido sórbico, 4 g de ácido ascórbico, 1 g de metilparabeno, 3 g de colesterol y 10 g de vitaminas vanderzant. La solución de agar y la combinación de ingredientes fueron mezclados al licuarse. Cuando la temperatura de la mezcla es menor a 50 °C se incorporan 0.25 gramos de tetraciclina, 1 mL de formaldehído al 37% y 4 mL de aceite de linaza. La mezcla final se deposita en los pozos de la caja de bioensayo para dar un área final de 2 cm<sup>2</sup>.

## Resultados y Discusión.

### La toxina Cry1Ca como un bioinsecticida potencial

A la fecha, la subclase de toxinas Cry1A específicas contra lepidópteros, representan al grupo de proteínas Cry más estudiado y que se utilizan ampliamente como método de control biológico, ya sea en formulaciones de aerosoles o en expresión transgénica. A pesar de que el espectro insecticida de la proteína Cry1Ca incluye a insectos lepidópteros que son completa o parcialmente tolerantes a las formulaciones basadas en Bt que se utilizan actualmente, su empleo como método de control no es tan extenso como el de las toxinas de la subclase Cry1A. Como se puede observar en la tabla VI, esta proteína es tóxica para un amplio rango de especies de insectos como: *Mamestra brassicae*, *Plutella xylostella* e incluso contra subespecies del género *Spodoptera* (entre otros). Estos insectos, los cuales no son controlados adecuadamente por toxinas Cry1A, causan grandes pérdidas a cultivos como el maíz, algodón y soya a nivel mundial (Avisar et al., 2009). Por otra parte, la utilidad de las proteínas Cry como método de control podría verse comprometida por el surgimiento de resistencia en los insectos blanco. Recientemente se aisló una población de campo de *P. xylostella* que al estar expuesta de manera constante a aerosoles basados en *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, presentó altos niveles de resistencia a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Fa, no obstante presentó niveles moderados de resistencia a la toxina Cry1Ca (Sayyed et al., 2005).

**Tabla VI.** Comparación de las dosis letales medias de toxinas de la subclase Cry1A y Cry1Ca probadas en distintos insectos.

Insecto	Toxina Cry	LC <sub>50</sub> †	Referencia
<i>Manduca sexta</i>	Cry1Aa	23	Schnepf et al., 1990
	Cry1Ab	10.2	Pacheco et al., 2009
	<b>Cry1Ca</b>	<b>10.2</b>	Este estudio
<i>Mamestra brassicae</i>	Cry1Aa	165 ng/mL	Gilliland et al., 2002
	Cry1Ac	>150000 ng/mL	
	<b>Cry1Ca</b>	<b>350 ng/mL</b>	
<i>Spodoptera exigua</i>	Cry1Ab	601	de Maagd et al., 2000
	<b>Cry1Ca</b>	<b>55</b>	
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Cry1Aa	>2000	Aranda et al., 1996
	Cry1Ab	>2000	
	<b>Cry1Ca</b>	<b>31</b>	
<i>Trichoplusia ni</i>	Cry1Aa	>2000	Iracheta et al., 2000
<b>Cry1Ca</b>	<b>12</b>		

† Las dosis letales medias (LC<sub>50</sub>) se muestran en ng/cm<sup>2</sup> a menos que se indiquen otras unidades.

Previamente se habían construido mutantes en la región β16 de la toxina Cry1Ab y como se puede observar en la Tabla VII la leucina 511 es un residuo muy importante ya que cuando se cambia por alanina se abate la toxicidad de la proteína en contra de *M. sexta*.

. **Tabla VII.** Dosis letal media de la toxina Cry1Ab y de sus mutantes sobre la región  $\beta 16$  del dominio III (Ocelotl, 2008)

Toxina	LC <sub>50</sub> (ng/cm <sup>2</sup> )
Cry1Ab	3.7 (1.6-6.9)
S509A	5.7 (4.6-7.2)
T510A	31.9 (14.7-201.7)
<b>L511A</b>	<b>&gt; 1000</b>
R512A	6.5 (5-9)
V513A	45 (26-105)
N514A	15.3 (10.3-25.7)

Con estos resultados comparamos la secuencia de la región  $\beta 16$  de la toxina Cry1Ab con la toxina Cry1Ca, la cual también es tóxica contra *M. sexta* y observamos que tres de los seis residuos que la componen se encuentran conservados. (Figura 9), incluyendo el residuo de leucina. Por esta razón, propusimos que en la toxina Cry1Ca estos residuos pueden tener un papel importante en la actividad tóxica contra *M. sexta*.

```

Cry1Ca  DILRRNTFGDFVSLQVNINSPITQRYRLRFY 525
Cry1Ab  DILRRTSPGQISTLRVNIITAPLSQRYRVRIRY 530

```

**Figura 9.** Alineamiento de las regiones  $\beta 16$  de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ca, en azul se muestran los aminoácidos que se encuentran conservados en ambas proteínas, la leucina conservada se denota con una cruz

### **Mutagénesis sitio dirigida.**

Cada uno de los seis aminoácidos que componen la región  $\beta$ 16 del dominio III de la toxina Cry1Ca fue sustituido por alanina (Figura 10) para evaluar el efecto en su actividad insecticida contra las larvas de *M. sexta*. Usando oligonucleótidos diseñados para realizar cambios puntuales fuimos capaces de generar las 6 variantes de la toxina Cry1Ca. Esto se confirmó al observar los resultados de secuenciación de algunas clonas obtenidas.

Al mismo tiempo se generaron las variantes correspondientes en el residuo N514 de la toxina Cry1Ab. Empleando el oligonucleótido N514-Ab, realizamos una mutagénesis a saturación sitio dirigida sobre la asparagina 514, se obtuvieron 9 variantes: N514S, N514M, N514I, N514L, N514Q, N514V, N514K, N514H y N514F. Esto con base en los resultados obtenidos por Shan y col., así como los obtenidos por Xiang y col., quienes demostraron la importancia de residuos de asparagina en regiones de interacción del dominio III de la toxina Cry1Ac, al generar variantes cuya toxicidad se ve afectada. El ADN de cada mutante se transformó en la cepa de *E.coli* SCS110 para recuperar el ADN no metilado que facilita la transformación en la cepa acristalífera de Bt.





**Figura 10.** Representación de cada una de las mutantes construidas sobre la región  $\beta 16$  del dominio III de la toxina Cry1Ca. De arriba hacia abajo: V505A, S506A, L507A, Q508A, V509A y N510A.

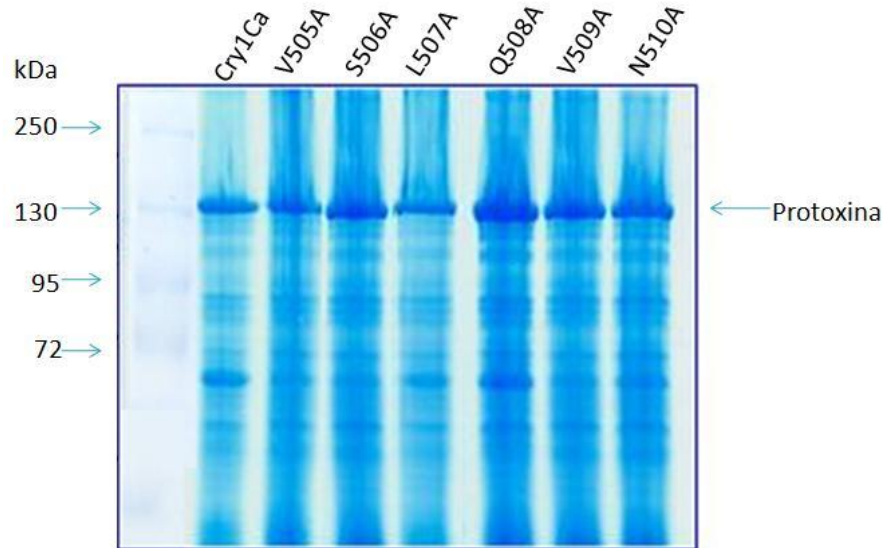
### **Análisis de la expresión de las mutantes y de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ca silvestres.**

Después de haber transformado en *B. thuringiensis* los ADN's con las mutaciones deseadas, procedimos a crecer algunas clonas (al menos 4) de cada una de ellas en medio de esporulación HCT para comprobar que ninguno de los cambios hubiese afectado la producción de los cristales, se analizaron 3  $\mu$ g de proteína total obtenida en la mezcla de esporas cristales. Los cambios introducidos tanto en la región  $\beta 16$  del dominio III de la toxina Cry1Ca, como en el residuo N514 de la toxina Cry1Ab, no afectaron la síntesis de los cristales en Bt. Esto se analizó observando los cristales al microscopio y por la presencia de una banda de la talla esperada de 130 kDa en geles de acrilamida desnaturalizantes al 10% (Figuras 11 A y 11 B respectivamente).

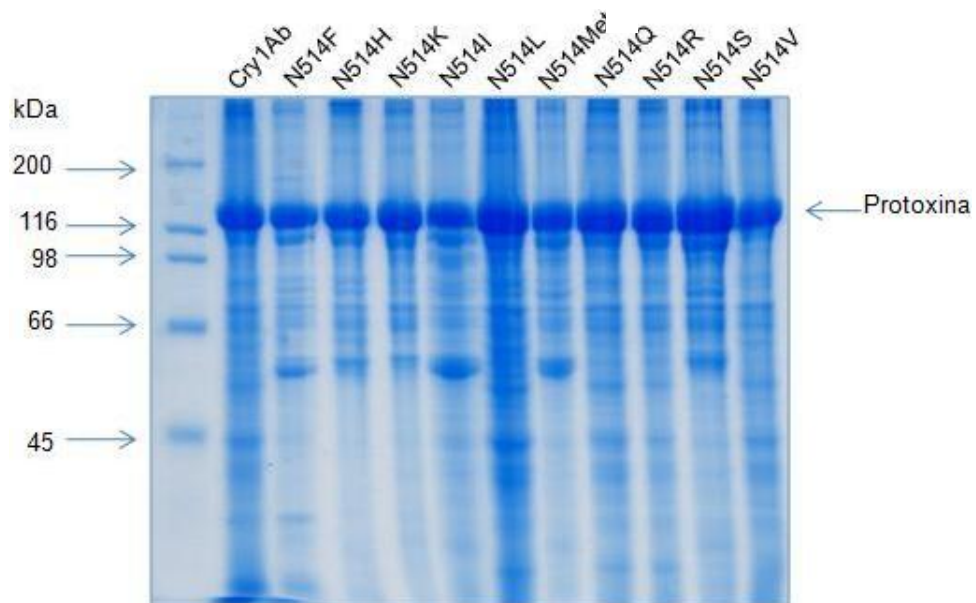
De este modo fue posible concluir que ninguno de los aminoácidos cambiados por alanina compromete la producción de los cristales de las mutantes. Es importante verificar la producción de los cristales ya que previamente se han reportado mutaciones en los diferentes dominios de la toxina Cry1Ab que resultan en nula o baja producción de cristales, fenómeno, que puede ser causado por un

plegamiento incorrecto de las proteínas o por la introducción de inestabilidad estructural (Nuñez-Valdéz et al, 2001; Padilla et al., 2006.).

A)



B)



**Figura 11. A)** Expresión de la toxina Cry1Ca silvestre y las mutantes correspondientes de la región  $\beta$ 16 del dominio III. **B)** Expresión de la toxina Cry1Ab silvestre y las mutantes sobre la asparagina 514 de la lámina  $\beta$ 16 del dominio III.

## **Solubilización y activación con tripsina de las toxinas Cry1Ca y Cry1Ab silvestres y sus respectivas mutantes.**

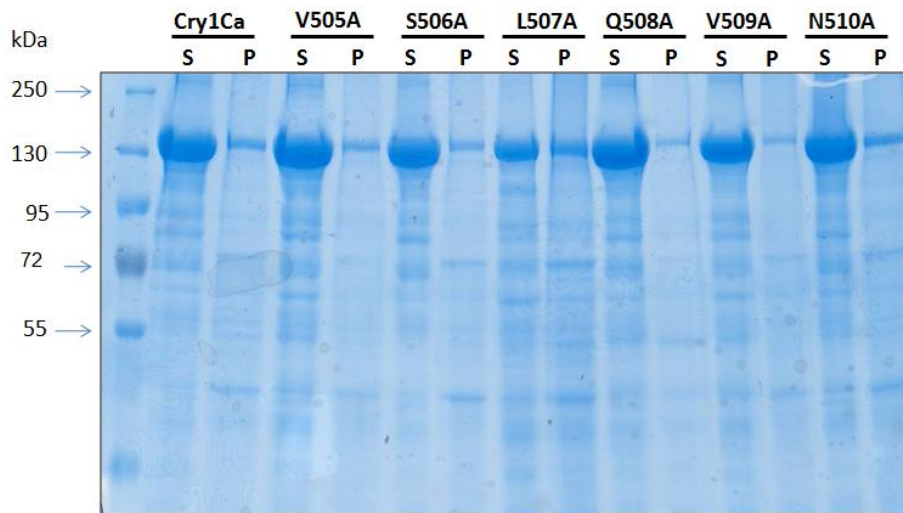
Después de observar que la producción de los cristales de las toxinas no estaba afectada, analizamos el procesamiento *in vitro* de los mismos para comprobar que las mutaciones no afectaban la estabilidad de las proteínas con respecto a las toxinas silvestres. El primer paso del procesamiento de los cristales es su solubilización en un ambiente alcalino y reductor, lo cual simulamos en un amortiguador con un pH de 10.5 más  $\beta$ -mecaptoetanol. Las fracciones solubles resultantes se analizaron en geles de acrilamida teñidos con azul de coomassie. Como se muestra en la Figura 12 A, todas las mutantes de la toxina Cry1Ca se solubilizaron correctamente y de modo similar a la toxina silvestre. El mismo tratamiento realizado a las variantes en el residuo N514 de la toxina Cry1Ab nos indicó que a excepción de las variantes N514I y N514F, el resto de los cambios que tenemos no afecta o compromete la solubilización de los cristales (Figura 12B). Este análisis es importante porque se han reportado mutantes a lo largo de toda la secuencia en diferentes toxinas Cry que afectan completa o parcialmente la solubilidad de los cristales y esto al mismo tiempo se refleja en la actividad tóxica. Por ejemplo, mutaciones sencillas sobre residuos de triptófano en las posiciones 117, 226 y 455 de la toxina Cry1Ab afectan la eficiencia de solubilización respecto a la toxina silvestre (Padilla et al., 2006).

En nuestro grupo de trabajo también hemos aislado de manera previa mutantes que poseen un fenotipo insoluble. En la toxina Cry1Ab observamos que al introducir una carga positiva sobre la leucina 511 o la valina 513 de la lámina  $\beta$ 16 del dominio II, obteníamos mutantes que perdían toxicidad, no obstante este fenómeno se relacionaba al hecho de que ambas eran incapaces de solubilizarse (Ocelotl., 2008). En el caso de las mutantes sobre la región  $\beta$ 16 del dominio III de la toxina Cry1Ca no observamos diferencias significativas respecto a la proteína silvestre. Todas las mutantes se solubilizaron de manera correcta.

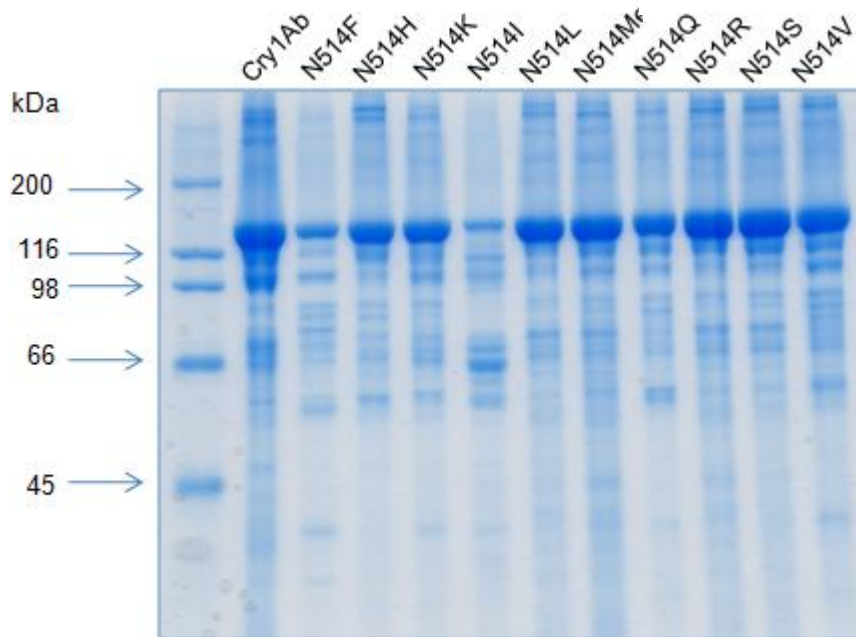
A continuación tomamos todas las muestras que se solubilizaron correctamente para determinar la estabilidad de las proteínas frente a la proteólisis. El procesamiento de las proteínas Cry por las proteasas gástricas es un paso importante para que puedan ejercer su efecto tóxico ya que en este se libera a la toxina activa. Para el procesamiento *in vitro* las proteínas se trataron con tripsina. Posterior al tratamiento, las fracciones solubles se analizaron mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes. En este análisis observamos que las mutantes de la región  $\beta$ 16 del dominio III de la proteína Cry1Ca se procesan de manera similar a la toxina silvestre (Figura 13 A), dando lugar al fragmento resistente a proteólisis o toxina activa con un peso molecular esperado de aproximadamente 65 kDa. Lo mismo se observó en el caso de las mutantes sobre la asparagina 514 de la lámina  $\beta$ 16 de la toxina Cry1Ab (Figura 13 B).

El analizar la estabilidad de las proteínas frente al procesamiento es importante, ya que cambios en la actividad insecticida de proteínas mutantes se pueden explicar como un efecto directo sobre la función de ésta o sobre la estabilidad global de la proteína (Seale J.W., 2006). Por ejemplo, en el dominio III de la toxina Cry1Ac se reportó la mutante W544C, la cual presenta 15 veces menos toxicidad respecto a la toxina silvestre; sin embargo al examinar su sensibilidad a proteasas se determinó que esta mutación la hace más susceptible al procesamiento proteolítico con tripsina o jugo gástrico, lo cual indica una menor estabilidad en presencia de las proteasas del insecto en el ambiente del intestino medio (Liu et al., 2010).

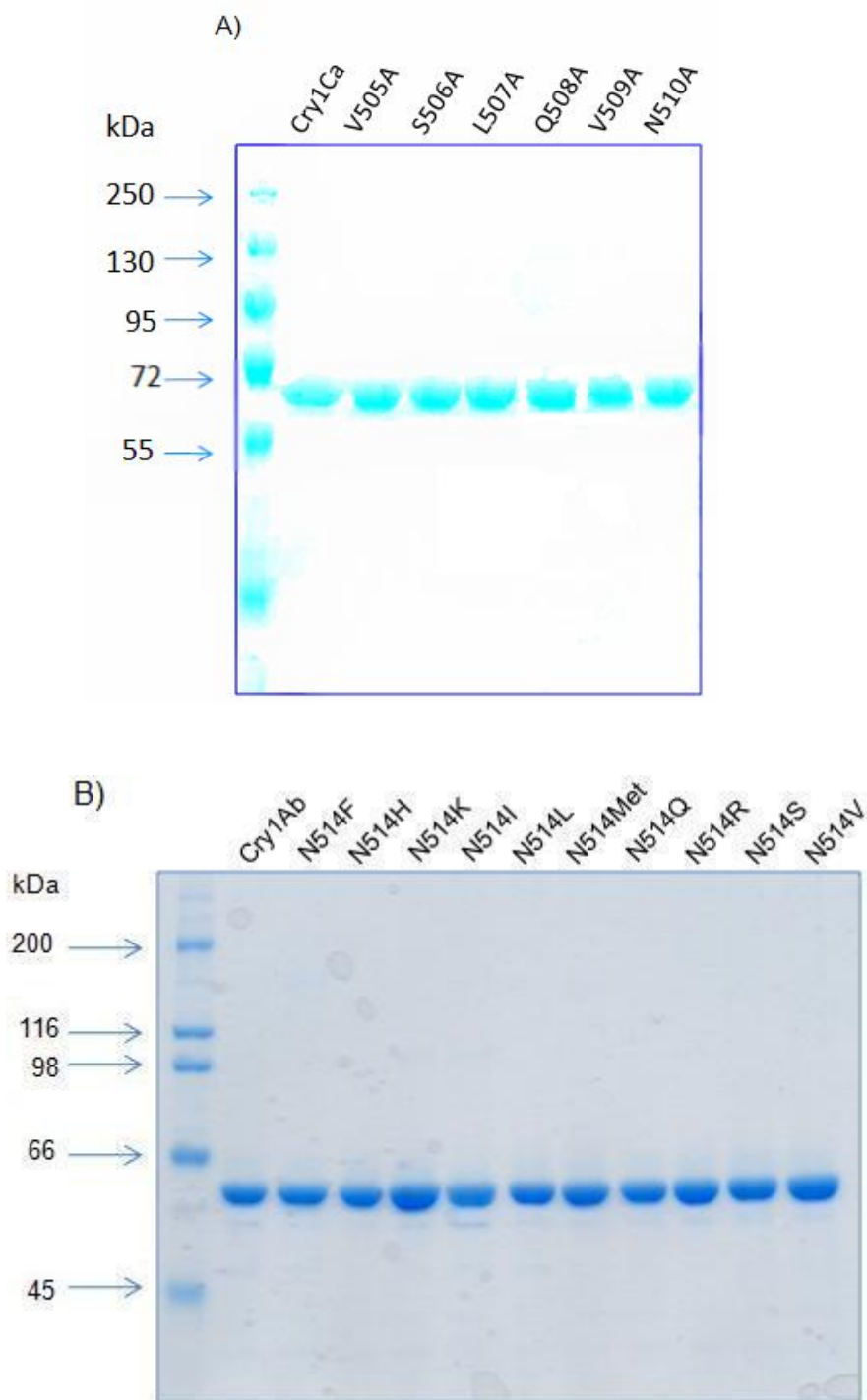
A)



B)



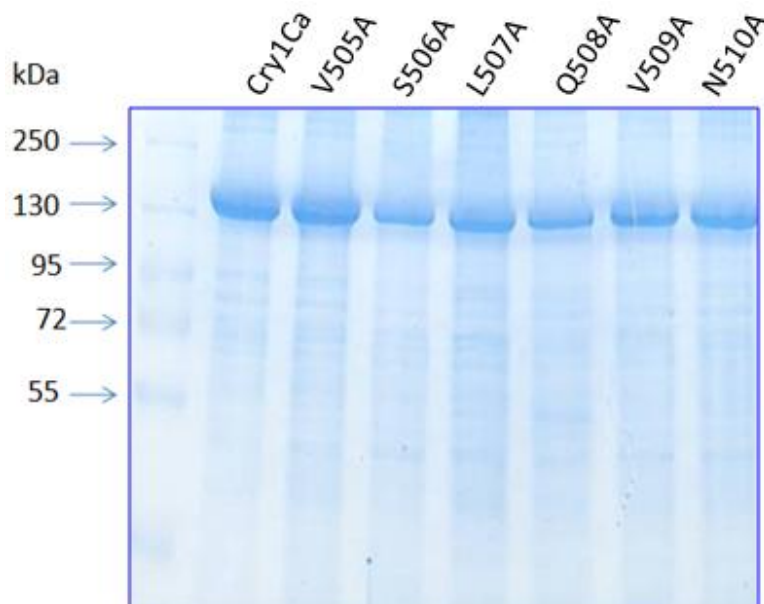
**Figura 12. A)** Solubilización de la toxina silvestre Cry1Ca, y de las toxinas mutantes sobre la región  $\beta$ 16 del dominio III. Se analizaron las fracciones de la pastilla (P) y el sobrenadante (S) **B)** Fracción soluble (sobrenadante) de las variantes sobre la asparagina 514 de la lámina  $\beta$ 16 de la toxina Cry1Ab. La variante N514I y N514 F no se solubilizan con la misma eficiencia que la toxina silvestre.



**Figura 13. A)** Activación con tripsina de la toxina silvestre Cry1Ca y las mutantes sobre la región  $\beta$ 16 del dominio III, **B)** y de la toxina silvestre Cry1Ab y las variantes sobre la N514 de la lámina  $\beta$ 16 del dominio III.

## Análisis de toxicidad de las mutantes de la región $\beta$ 16 del dominio III de la toxina Cry1Ca.

Después de comprobar que las mutaciones introducidas no afectaron la producción de las proteínas, ni comprometió su solubilización y activación proteolítica, analizamos el efecto en la toxicidad de cada una de las mutantes tanto de la toxina Cry1Ca como las de la toxina Cry1Ab, y las comparamos con las actividades de las toxinas silvestres. Para este análisis, purificamos los cristales de cada toxina empleando gradientes discontinuos de sacarosa y así poder determinar con estas muestras, su dosis letal media contra larvas de *M. sexta*. En la Figura 14 se muestran las fracciones purificadas de cada una de las mutantes de la región  $\beta$ 16 de la toxina Cry1Ca. En este gel se analizó la misma cantidad de proteína de cada una de las mutantes.



**Figura 14.** Fracciones de los cristales purificados de la toxina Cry1Ca y las mutantes sobre la región  $\beta$ 16 del dominio III. Se resolvieron 2  $\mu$ g de cada proteína.

Para la determinación de la dosis letal media ( $LC_{50}$ ), las larvas neonatas de *M. sexta* fueron retadas con cinco dosis crecientes de la proteína Cry1Ca silvestre y de cada una de las mutantes (5, 10, 25, 50 y 250 ng/cm<sup>2</sup>). Se analizaron las tres formas de las proteínas. Los cristales insolubles formados por protoxinas empacadas en la inclusión paraesporal (masa molecular: 130kDa), las protoxinas solubles obtenidas al solubilizar los cristales (masa molecular: 130 kDa) y las toxinas activas que se obtienen al procesar proteolíticamente las protoxinas solubles (masa molecular: 65kDa). Esto, debido a que previamente se han observado diferencias en la toxicidad dependiendo de la forma en la cual se emplea la proteína (Abdul Rauf and Ellar, 1999; de Maagd et al., 2000). Después de siete días se registraron los porcentajes de mortalidad y se analizaron con el software **Probit** (para mayores detalles revisar la sección de materiales y métodos). En la tabla VII se presentan los valores de  $LC_{50}$  calculados para la toxina silvestre y para cada una de las mutantes.

#### **Toxicidad de las mutantes de la toxina Cry1Ca probadas como cristales, protoxina y toxina activa.**

Al calcular los valores de  $LC_{50}$  de los cristales de las mutantes por alanina sobre la región  $\beta 16$  del dominio III de la toxina Cry1Ca, observamos que no existen diferencias de toxicidad al compararlas con la proteína silvestre, ya que los límites de confianza sobrelapan en todos los casos (Tabla VII). El mismo resultado se obtuvo cuando probamos las proteínas mutantes de la lámina  $\beta 16$  de la toxina Cry1Ca en la forma de protoxina soluble, observamos que no se presentó ninguna diferencia en cuanto a la actividad biológica ya que de manera similar al resultado obtenido con los cristales, los límites de confianza sobrelapan lo cual indica que no hubo cambios (Tabla VII).



Como se puede apreciar en la Tabla VIII, en los datos obtenidos al probar las proteínas mutantes en su forma activa (fragmento procesado de 65 kDa), no se observaron diferencias entre la toxina Cry1Ca silvestre activada y las proteínas mutantes sobre la lámina  $\beta$ 16. Con esto confirmamos que las mutaciones no tuvieron efecto alguno sobre la actividad biológica de la proteína.

**Tabla VIII.** Dosis letal media de la proteína Cry1Ca y las mutantes sobre la región  $\beta$ 16 del dominio III en sus formas de cristales, protoxina y toxina activa probadas contra *M. sexta*.

Proteína	LC <sub>50</sub> ng/cm <sup>2</sup>		
	Cristales	Protoxina	Toxina
Cry1Ca	10.2 (6-14.5)	6.7 (3.1-10.5)	23.3 (14.6-35.2)
V505A	12.2 (8.2-17)	8.8 (3.8-14.4)	42.5 (23.4-81.7)
S506A	16 (9.1-25)	6.6 (3.5-10)	26.7 (14.8-45.3)
L507A	12 (8-17)	15.5 (7.5-25.7)	40.1 (23.2-71.7)
Q508A	10.7 (6.1-16)	18.4 (9.5-30.5)	39.1 (25.2-65)
V509A	9.1 (5.8-12.5)	16.6 (9.8-22.5)	31 (21.4-44.5)
N510A	13.8 (9.8-18.8)	14 (9.4-19.3)	25 (16.2-36.8)

Los números entre paréntesis indican los límites de confianza.

### **Comparación de la toxicidad de las proteínas mutantes en su forma activa con sus respectivas formas protóxicas y cristales.**

Al analizar la LC<sub>50</sub> de las mutantes sobre la región  $\beta$ 16 del dominio III de la toxina Cry1Ca en su forma activa, notamos que al comparar los valores obtenidos en los ensayos con las proteínas activas, con los valores obtenidos empleando las formas de protoxina y toxina, observamos que, de manera general las mutantes

V505A, L507A, Q508A y V509A son entre 3 y 4 veces menos tóxicas que sus respectivos cristales y protoxinas. Este fenómeno, en el cual la forma activa de la toxina es menos tóxica que los cristales y la protoxina correspondiente se ha observado previamente. En un estudio realizado por de Maagd y colaboradores en el cual se evaluó la toxicidad de las construcciones quiméricas BBC13 y BBC15 (mencionadas en la Tabla II) en contra de *S. exigua*, observaron que éstas en su forma activa presenta una toxicidad baja o nula respecto a la observada cuando realizaron bioensayos con las proteínas en su forma de protoxina. En el caso de nuestras mutantes la disminución en toxicidad de la forma activa respecto a los cristales y protoxinas no es tan drástica como en el caso de las proteínas quiméricas, lo cual podemos explicar con base en diferencias en la estabilidad frente al procesamiento proteolítico. Las construcciones quiméricas BBC13 y BBC15 al ser activadas *in vitro* generaron una banda de 55 kDa cuyo peso es menor al esperado que es de aproximadamente 65 kDa (de Maagd et al., 2000). En contraste las mutantes que construimos sobre la región  $\beta$ 16 del dominio III de la toxina Cry1Ca, generan un fragmento activo de 65 kDa. No obstante, la proteína al estar completamente procesada puede sufrir cortes proteolíticos adicionales al ingresar al tracto digestivo del insecto, lo cual podría disminuir su toxicidad. Se ha demostrado que la toxina Cry1Ab en su forma activa (masa molecular: 65 kDa) al ser incubada con jugo gástrico de *Ostrinia nubilalis*, puede ser procesada dando lugar a fragmentos de menor peso molecular al compararse con el procesamiento con tripsina bovina (Siqueira et al., 2004), esto podría explicar las diferencias en toxicidad de las mutantes V505A, L507A, Q508A y V509A en su forma de toxina activa respecto a su toxicidad en forma de cristales o protoxina.

### **Análisis de toxicidad de las variantes sobre la asparagina 514 de la lámina $\beta$ 16 de la toxina Cry1Ab.**

Durante el desarrollo de este proyecto Xiang y colaboradores reportaron que el residuo N546 en el dominio III de la toxina Cry1Ac es importante para unión y toxicidad contra *H. armigera*. En este estudio los autores realizaron cambios del

residuo N546 por A, G, D, y K y observaron que el cambio por A incrementó la toxicidad aproximadamente dos veces, mientras que los cambios por D y K disminuyen 10 veces este valor. En la región  $\beta$ 16 del dominio III de la toxina Cry1Ab tenemos el residuo N514 y analizamos el efecto generado al cambiarlo por otros aminoácidos en su actividad tóxica contra *M. sexta*. De hecho al determinar los valores de LC<sub>50</sub> (Tabla IX) de las variantes que obtuvimos no observamos aumento de la toxicidad con respecto a la toxina silvestre. Sin embargo las mutantes, N514H, N514I, N514M, N514S y N514V disminuyen entre 1 y 3 veces la toxicidad, lo que hace suponer que este aminoácido participa en la toxicidad aunque no es esencial.

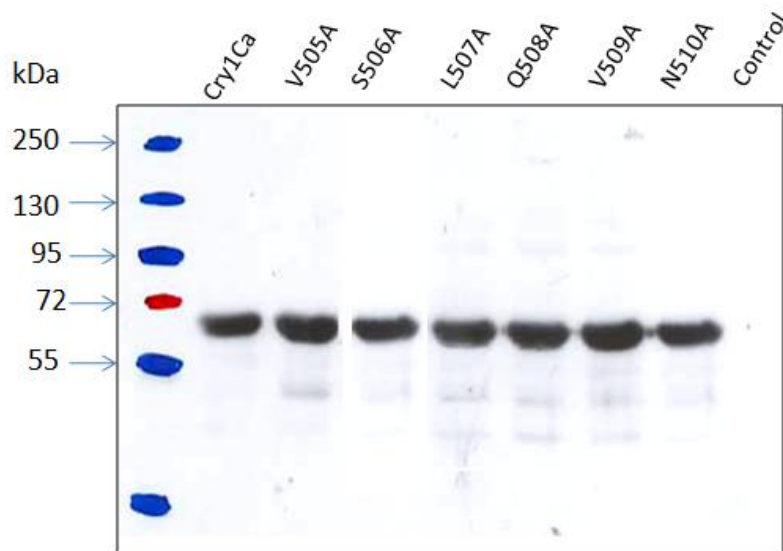
**Tabla IX.** Dosis letal media de los cristales de la proteína Cry1Ab y las variantes sobre la N514 de la región  $\beta$ 16 del dominio III probadas contra *M. sexta*.

Proteína	LC <sub>50</sub> (ng/cm <sup>2</sup> )
Cry1Ab	0.86 (0.25-1.51)
N514F	0.9 (0.25-1.5)
N514H	1.6 (0.8-2.6)
N514I	3.3 (2-2.51)
N514K	0.7 (0.15-1.3)
N514L	0.6 (0.7-1.2)
N514M	1.6 (0.8-2.4)
N514Q	0.5 (0.5-1.1)
N514S	1.2 (0.5-1.9)
N514V	1.4 (0.7-2.3)

Los valores entre paréntesis indican los límites de confianza.

### Ensayo de unión de la toxina Cry1Ca y sus mutantes a VMMA'S de *M. sexta*.

Finalmente, debido a que la unión de las toxinas Cry a sitios que se encuentran en las microvellosidades del intestino medio representa un paso clave para que la proteína pueda ejercer su efecto tóxico en el insecto blanco (Van Rie et al., 1990), analizamos el efecto de las mutaciones en la unión de la toxina a vesículas purificadas a partir del tejido intestinal de larvas de *M. sexta*. Con base en los resultados obtenidos en los bioensayos, esperabamos que en el ensayo de unión (para detalles consultar la sección de materiales y métodos) no se observaran diferencias en la capacidad de unión de las mutanes, los datos obtenidos corroboraron la noción de que al no estar afectadas en su actividad *in vivo* tampoco se afectó su capacidad de interacción (figura 15).

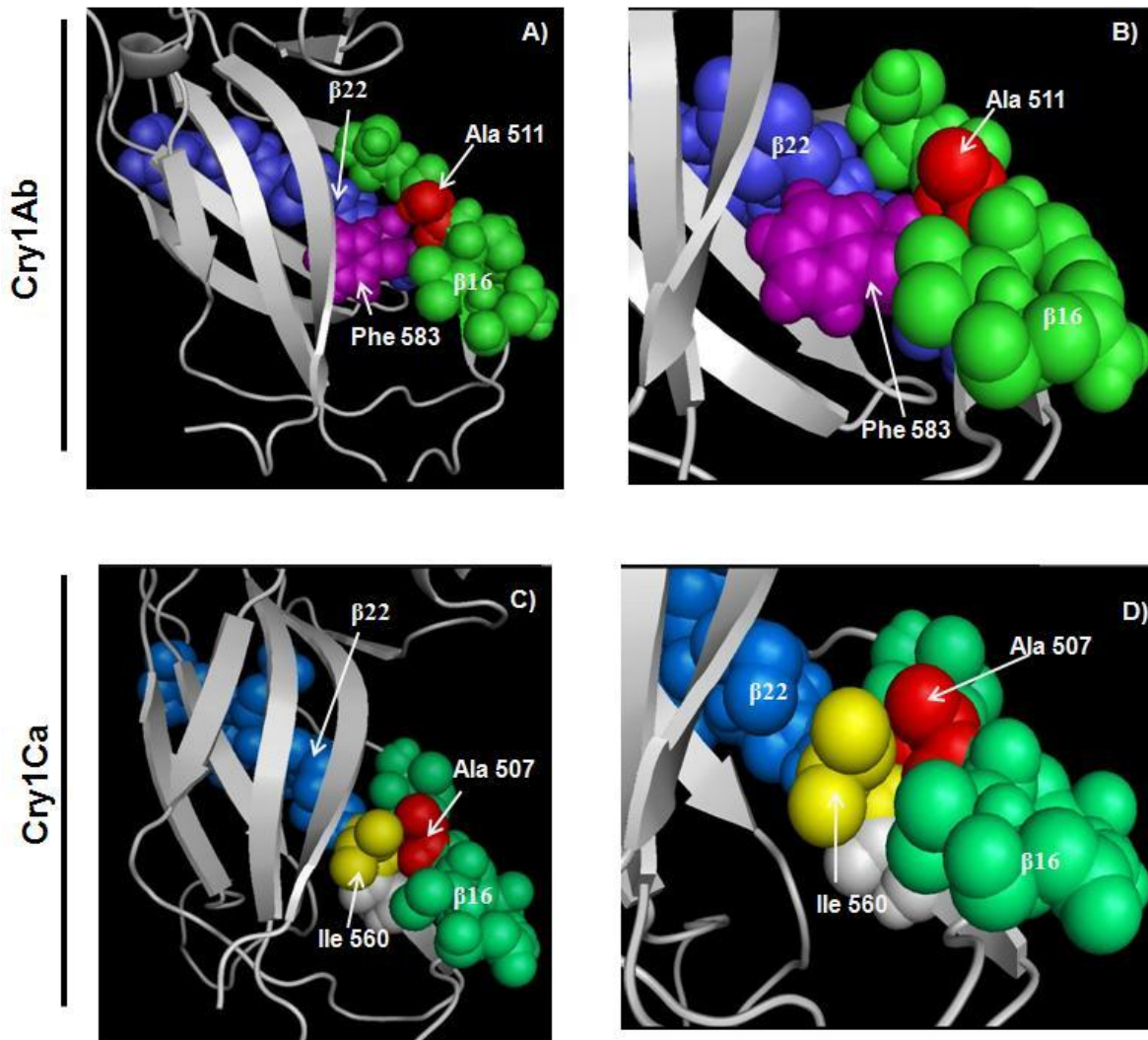


**Figura 15.** Ensayo de unión de la toxina Cry1Ca silvestre y las mutantes de la región  $\beta$ 16 del dominio III de ésta. En el carril del control sólo se incubaron las VMMA's con buffer de unión.

## **Análisis de la estructura tridimensional teórica de las toxinas Cry1Ca y Cry1Ab.**

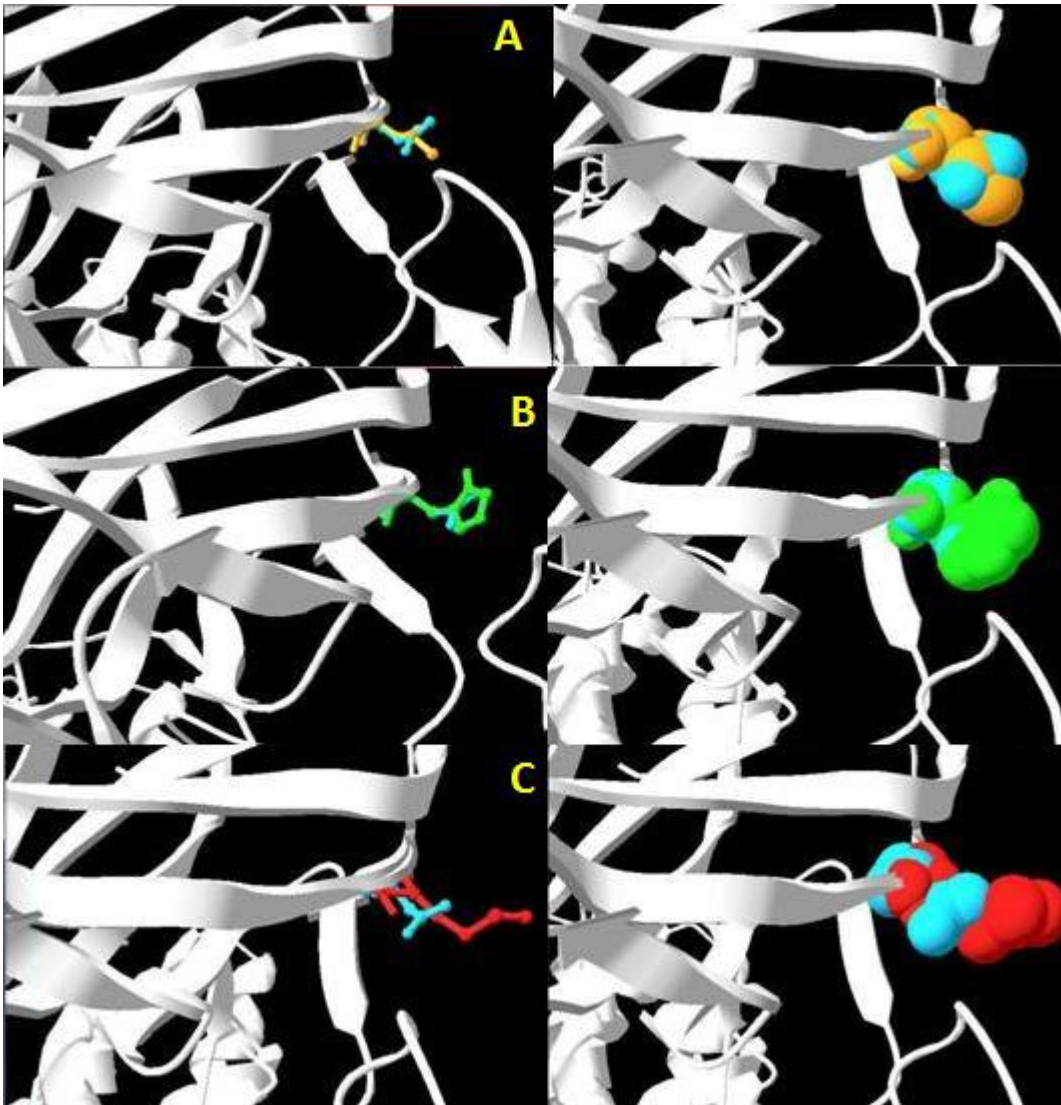
Para entender los resultados que obtuvimos en este estudio, generamos un modelo de la estructura tridimensional teórica de la toxina Cry1Ca y lo comparamos con un modelo de la estructura tridimensional de la toxina Cry1Ab, tomando como referencia la estructura de la toxina Cry1Aa. En un estudio previo con la toxina Cry1Ab, observamos que al mutar la leucina 511 (cambio por alanina) se abate la toxicidad, con base en esta observación esperábamos que al mutagenizar el residuo equivalente en la toxina Cry1Ca (Leucina 507) la toxicidad disminuyera. Sin embargo, no observamos efecto alguno sobre la toxicidad al mutagenizar la región  $\beta$ 16 del dominio III de la proteína Cry1Ca. Al analizar la estructura tridimensional teórica de ambas proteínas notamos diferencias estructurales que podrían explicar este fenómeno. Como se puede apreciar en la Figura 16 (paneles A y B), al eliminar la cadena lateral del residuo de leucina en la lámina  $\beta$ 16 del dominio III de la toxina Cry1Ab, se pierde contacto con el residuo de fenilalanina 583, creando un espacio dentro de la estructura de la proteína, en el cual alanina puede adaptar distintas conformaciones. Esto podría afectar el posicionamiento de los demás aminoácidos que forman la lámina  $\beta$ 16, de manera que la conformación en la toxina mutante L511A no es óptima la interacción abatiendo su toxicidad.

Por otro lado en el caso de la toxina Cry1Ca al mutagenizar la posición equivalente, el residuo de leucina 507, observamos que al eliminar la cadena lateral no se pierde contacto (Figura 16 panel C y D), de hecho la cadena lateral de la isoleucina 560 se encuentra en contacto con la alanina 507 en la proteína mutante, lo cual evitaría cambios conformacionales drásticos en la estructura de la proteína que pudieran afectar la toxicidad.



**Figura 16.** Modelos tridimensionales del dominio III de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ca. **A)** En el caso de la toxina mutante L511A de Cry1Ab se observa que la alanina (en rojo) no contacta a la fenilalanina 583 (morado). **B)** se muestra un acercamiento da **A)** para enfatizar el espacio creado por la ausencia de la cadena lateral en la mutante L511A. **C)** Contacto entre la isoleucina 560 y la alanina 507 en la mutante L507A de la toxina Cry1Ca este contacto podría evitar cambios conformacionales que afecten la toxicidad. **D)** Acercamiento de **C)**.

Respecto a las variantes sobre la N514 de Cry1Ab decidimos analizar la estructura teórica de las mutantes N514I, N515H y N514M, cuya toxicidad disminuyó respecto a la toxina silvestre, para determinar si se habían provocado cambios conformacionales importantes en la estructura de la proteína. El residuo de asparagina en la posición 514 se encuentra expuesto hacia el solvente, la superficie de exposición de este aminoácido es de ~25%. Al calcular los valores de exposición de las variantes N514I, N514H y N514M, encontramos que son de 28, 31 y 42% respectivamente. En la Figura 17 se muestran los modelos construidos para cada una de las mutantes; todas las mutantes mostraron una apariencia muy similar a la toxina silvestre, sin afectar la estructura de manera importante, las diferencias observadas involucran a las cadenas laterales y a su superficie de exposición. Como se aprecia en la figura al superponer las variantes sobre el residuo de asparagina (color azul) se observa que en todos los casos las cadenas laterales ocupan un mayor volumen en el espacio, esto podría tener como consecuencia la creación de un impedimento estérico que afecte en alguna forma la interacción entre la proteína y su receptor sin abatirla. La presencia de la histidina no tiene efectos adicionales ya que a pH 10.5 la histidina es neutra y su superficie de exposición es muy similar a la del residuo de asparagina en la toxina silvestre. La mutante N514H presenta una  $LC_{50}$  similar a la de la mutante N514M, ésta última posee la cadena lateral más voluminosa, sin embargo esta puede adquirir diferentes conformaciones que no afecten la interacción. Es interesante notar que en el caso de la mutante N514I es la más afectada en toxicidad a pesar de que la diferencia en la superficie de exposición no es grande, no obstante el cambio de la asparagina, que es un aminoácido polar sin carga, por la isoleucina, un aminoácido de naturaleza hidrofóbica podría explicar este fenómeno.

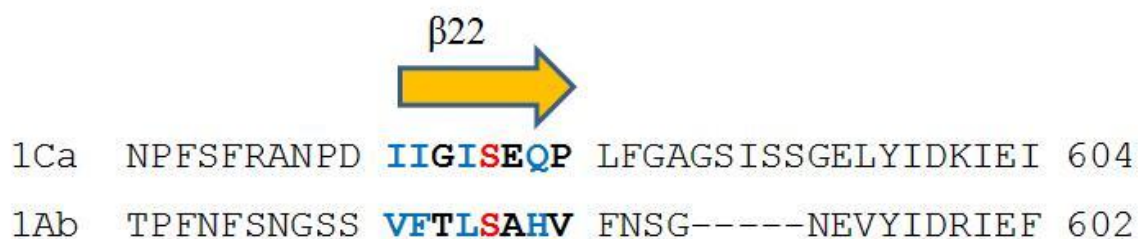


**Figura 17.** Superposición de la estructura tridimensional de las variantes sobre la N514 y la toxina silvestre, el residuo de asparagina se muestra en color azul en todos los casos, del lado izquierdo se muestra el radio de Van der Waals de cada una de las sustituciones hechas. A) Mutante N514I: el residuo de isoleucina se muestra en anaranjado, la superficie de exposición aumenta de 25 a 28%. B) Mutante N514H: el residuo de histidina se muestra en verde, la superficie de exposición aumenta de 15 a 31%. C) Mutante N514M: el residuo de metionina se muestra en rojo, la superficie de exposición aumenta de 25 a 42%.



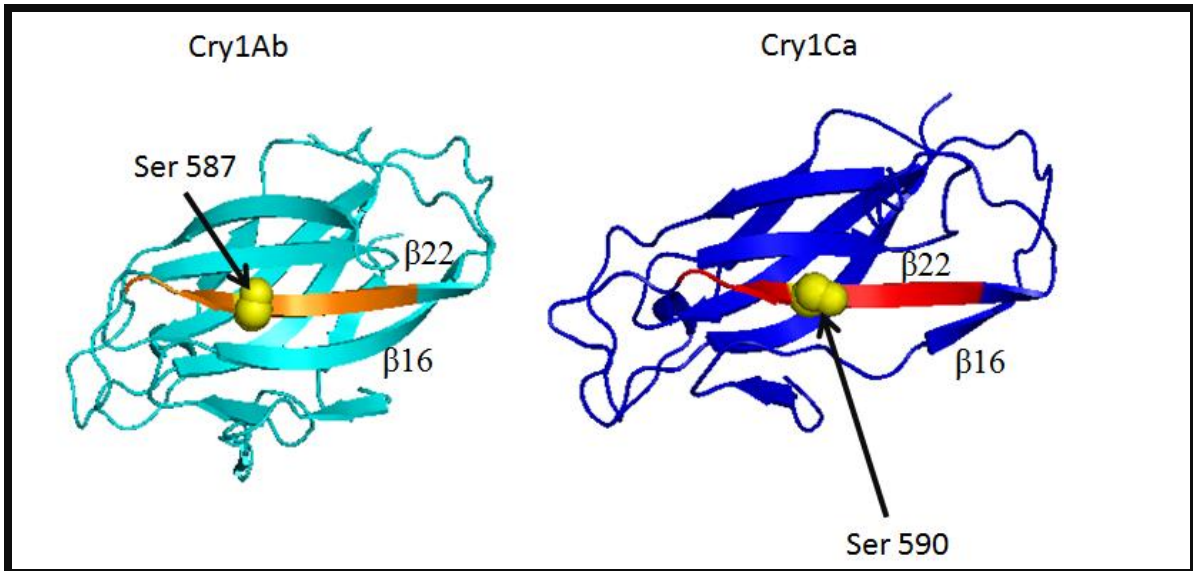
## Mutagénesis y análisis del residuo conservado S590 de la región $\beta$ 22 de la toxina Cry1Ca

En nuestro estudio previo con la toxina Cry1Ab demostramos la importancia de la serina en la posición 587, porque al cambiarla por alanina, la proteína perdió su actividad insecticida contra *M. sexta* (Tesis de licenciatura Josué Ocelotl, 2008). En la Figura 18 se presenta un alineamiento de la lámina  $\beta$ 22 de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ca donde se aprecia que a pesar de la baja identidad entre ellas, los cambios en los residuos de aminoácidos presentes en la proteína Cry1Ca son conservativos en su gran mayoría (estos cambios se denotan en azul). Además existe un residuo de serina que se conserva en ambas proteínas.



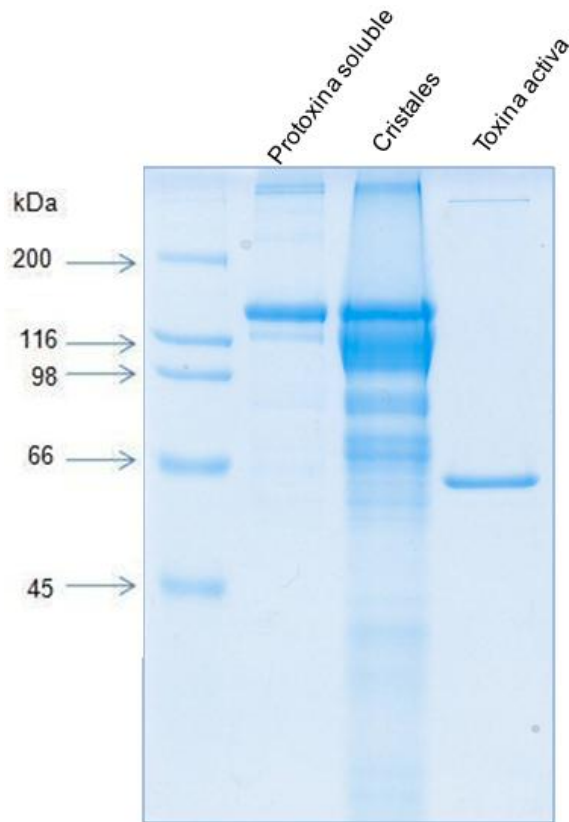
**Figura 18.** Alineamiento de la región  $\beta$ 22 del dominio III de las toxinas Cry1Ca y Cry1Ab, los cambios conservativos se muestran en azul, la serina conservada se muestra en rojo.

Al comparar la orientación de la serina 587 en la toxina Cry1Ab con la serina 590 de la toxina Cry1Ca, notamos que en ambas proteínas este residuo se orienta hacia el solvente (Figura 19), y como en la toxina Cry1Ab se afecta la toxicidad al cambiarlo por alanina, realizamos el cambio en la toxina Cry1Ca para evaluar su efecto. La variante S590A en la toxina Cry1Ca se obtuvo del mismo modo que las mutantes en la región  $\beta$ 16. Después de observar que la mutante S590A se expresa de modo similar a la toxina silvestre, analizamos la solubilización y activación de la proteína mutante. Como se puede observar en la Figura 20, la toxina mutante S590A se solubiliza y se activa de manera correcta.



**Figura 19.** Orientación de la serina conservada en la lámina  $\beta 22$  del dominio III de las toxinas Cry1Ca (panel izquierdo) y Cry1Ab (panel derecho). La serina conservada se representa con esferas.

Posteriormente determinamos el valor de  $LC_{50}$  contra *M. sexta* con los cristales purificados y obtuvimos un valor de  $7.8 \text{ ng/cm}^2$  (5-13), que al ser comparado con el valor de  $LC_{50}$  de la toxina silvestre ( $10.2 \text{ ng/cm}^2$  (6-14.5)) se aprecia que no hay efecto sobre el mismo. Esto nos indica que aunque en la toxina Cry1Ab las láminas  $\beta 16$  y  $\beta 22$  del dominio III son importantes en la actividad insecticida, no sucede lo mismo en la toxina Cry1Ca a pesar de que hay residuos conservados en ambas proteínas y más aún cuando ambas tienen actividad tóxica contra *M. sexta*.



**Figura 20.** Solubilización, expresión y procesamiento de la toxina mutante S590A localizada en la región  $\beta$ 22 de la toxina Cry1Ca, la proteína se solubiliza y procesa de manera correcta.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, de manera general es difícil predecir el efecto de una mutación en la actividad biológica de las toxinas Cry, y el efecto de las mutaciones puede variar dependiendo del insecto contra el cual la proteína es ensayada. En un estudio en el que se analizó el papel del asa 3 del dominio II de la toxina Cry1Aa, al realizar una delección de los aminoácidos  $^{440}\text{AAGA}^{443}$  se observó una disminución en toxicidad de más de 62 veces en contra de *B. mori*, mientras que en el caso de *M. sexta* solo se observó una disminución de 28 veces, es decir la misma delección afecta de manera diferencial la toxicidad dependiendo

el insecto en el cual se pruebe (Rajamohan et al., 1996). Por otro lado se reportó una mutante cuadruple en la toxina Cry1Ca denominada pPB20 en la cual los aminoácidos <sup>541</sup>STGV<sup>544</sup> fueron reemplazados por alanina, en la cual se afecta la toxicidad en contra de *S. exigua*, sin embargo la proteína retuvo su toxicidad en contra de *M. sexta* (Herrero et al., 2004). A pesar de que no observamos cambios de toxicidad en contra de *M. sexta*, no descartamos que estas mutaciones pueden tener efectos importantes en la toxicidad contra otros lepidópteros, lo cual deberá ser evaluado en estudios posteriores.

## Conclusiones:

Se logró la construcción de las mutantes sencillas sobre la región  $\beta 16$  del dominio III de Cry1Ca y la mutante S590A en la región  $\beta 22$ . Lo mismo se logró con las mutantes sobre la asparagina 514 de la lámina  $\beta 16$  de la toxina Cry1Ab, sin afectar la producción de los cristales de la toxina.

Las mutantes de la región  $\beta 16$  del dominio III de la toxina Cry1Ca no se ven afectadas en los procesos de solubilización ni procesamiento proteolítico.

Las mutantes N514I y N514F de la toxina Cry1Ab no se solubilizan de manera eficiente.

Las mutaciones introducidas en la región  $\beta 16$  del Dominio III de Cry1Ca, así como la mutación S590A en la lámina  $\beta 22$ , no tuvieron efectos importantes sobre la toxicidad contra *M. sexta*. El mismo fenómeno fue observado en las mutantes sobre la asparagina 514 de la lámina  $\beta 16$  de la toxina Cry1Ab

Las mutantes de la región  $\beta 16$  del dominio III de Cry1Ca se unen a vesículas purificadas a partir del tejido intestinal de *M. sexta*, del mismo modo que la toxina silvestre.

A diferencia de la toxina Cry1Ab las láminas  $\beta 16$  y  $\beta 22$  no son las más importantes para la toxicidad de Cry1Ca contra *M. sexta*.

**Perspectivas:**

Probar el efecto tóxico de las mutantes generadas en este estudio contra otros insectos para evaluar el papel de estas regiones del dominio III de la toxina Cry1Ca.

En el análisis realizado con los modelos tridimensionales de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ca observamos que la lámina  $\beta$ 16 no se encuentra en una conformación similar. A pesar de que es un modelo teórico, este puede servir de base para el diseño más racional de toxinas, al permitir la localización de residuos expuestos que puedan tener un papel esencial en la toxicidad de la proteína Cry1Ca contra *M. sexta*.

## Literatura Citada:

Abdul-Rauf, M., Ellar, D.J. 1999. Mutations of loop 2 and loop 3 residues in domain III of *Bacillus thuringiensis* Cry1C  $\delta$ -endotoxin affect insecticidal specificity and initial binding to *Spodoptera littoralis* and *Aedes aegypti* midgut membranes. *Curr. Microbiol.* 39(2):94-98.

Agaisse, H., Lereclus, D. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal protein? *J. Bacteriol.* 177(21):6027-32.

Angus, T. A. 1956. Association of toxicity with protein crystalline inclusions of *Bacillus sotto Ishiwata*. *Can. J. Microbiol.* 2: 122-131.

Aranda, E., Sanchez, J., Peferoen, M., Güereca, L., and Bravo, A. 1996. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins with the Midgut Epithelial Cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) *J. of Invert. Pathol.* 68: 203-212.

Arenas, I., Bravo, A., Soberón, M., and Gómez, I. 2010. Role of Alkaline Phosphatase from *Manduca sexta* in the Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin. *J. Biol. Chem.* 285: 12497-12503. Aronson, A.I., and Shai, Y. 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.* 195:1-8.

Atsumi, S., Mizuno, E., Hara, H., Nakanishi, K., Kitami, M., Miura, N., Tabunoki, H., Watanabe, A., and Sato, R., 2005. Location of the *Bombyx mori* Aminopeptidase N type 1 binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa Toxin. *Appl. Env. Microbiol.* 71: 3966-3977.

Avisar, D., Eilenberg, H., Keller, M., Reznik, N., Segal, M., Sneh, B. and Zilberstein, A. 2009. The *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C as a potential bioinsecticide in plants. *Plant Scien.* 176:315-324.

Bishop, D. H. L. 1994. Biopesticides. *Curr. Opin. Biotech.* 5:307-311

Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D.J. and Li, J., 2005. Crystal structure of the mosquito larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* 348: 363-382.

Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, Ch. and Lescar, J. 2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.5 Å resolution. *J. Bacteriol.* 188: 3391-3401.

Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Zhuang, M., et al. 2004. Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction with membrane microdomains. *Biochem Biophys Acta* 1667:38–46.

Bravo, A., Gill, S. S., Soberón M., 2005. *Bacillus thuringiensis* Mechanisms and Use In: *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier BV, Amsterdam, pp.175-206.

Bravo, A., Sarjeet, S.G., and Soberón, M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon.* 49: 423-435.

Bravo, A. and Soberón, M. 2008. How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends in Biotech.* 26: 573-579.

Brogdon, W.G. and McAllister, J.C. 1998. Insecticide resistance and vector control. *Emerg. Infect. Dis.* 4(4) :605-613

Cantón, P.E., Reyes, E.Z., Ruiz de Escudero, I., Bravo, A., Soberón, M. 2010. Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. *Peptides.* 32(3):595-600.

Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., and Dean D.H. 1998. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(3):807-13.



Crickmore N. 2005. Beyond the spore- past future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. J Appl Microbiol. 101(3):616-619.

Cunningham, B.C. and Wells J.A. 1989. High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. Science 244(4908):1081-5.

Derbyshire., D.J., Ellar, D.J. and Li, J. 2001. Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine. Acta Crystallogr. Sect. 57:1938-1944.

FAO. 2001. El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2001.

Finney, D.J., Ed.(1952). Probit analysis. Cambridge, England, Cambridge University Press.

Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J.R., Pangborn, W., English L. 2001. Structure of the insecticidal bacterial  $\delta$ -endotoxin CryBb1 of *Bacillus thuringiensis* . Acta Cryst. Allogr. 57: 1101-1109.

Gatehouse, J.A. 2008. Biotechnological prospects for engineering insect-resistant plants. Plant. Physiol. 146: 881-887.

García-Robles, I., J. Sánchez, A. Gruppe, A.C., Martínez-Ramírez, C., Raussell, M.D. Real, A. Bravo., 2001. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* PS86Q3 strain in hymenopteran forest pests. Insect. Biochem. Mol. Biol. 31: 849-856.

Gilliland, A., Chambers, C.E., Bone, E.J., Ellar, D.J. 2002. Role of *Bacillus thuringiensis* Cry1 delta endotoxin binding in determining potency during lepidopteran larval development. Appl. Environ. Microbiol. 68(4):1509-15.

Goldberg, L.J., and Margalit, J. 1977. A Bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sargentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens*. Mosquito News. 37:355-358.

Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., Soberón, M., 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of hélix  $\alpha$ -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. FEBS Lett. 513:242-246.

Gómez, I., Arenas, I., Miranda-Ríos, J., Becerril, B., Grande, R., Almagro, J.C., Bravo, A., Soberón, M., 2006. Specific epitopes of Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N Receptors in *Manduca sexta*. J. Biol. Chem. 281: 34032-34039.

Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.L., Brousseau, R., Cygler, M., 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. J. Mol. Biol. 254: 447-464.

Guo, S., Ye, S., Liu, Y., Wei, L., Xue, J., Wu, H., Song, F., Zhang, J., Wu, X., Huang, D. and Rao, Z. 2009. Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. J Struct Biol. 168(2):259-66

Herrero, S., González-Cabrera, J., Ferré, J., Bakker, P.L. and de Maagd R.A. 2004. Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. Biochem. J. 384:507-513.

Iracheta, M.M., Pereyra-Alfárez, B., Galán-Wong, L., Ferré, J. 2000. Screening for *Bacillus thuringiensis* crystal proteins active against the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. J. Invertebr. Pathol. 76(1):70-5.

Jiménez-Juárez, N., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Saab-Rincón, G., Damián-Almazo, J.Y., Gill, S.S., Soberón, M., Bravo, A. 2007. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta*. J. Biol. Chem. 282(29):21222-9

Jong Yul, R., Young Choi, J., Shun Li, M., Rae Jin, B., and Ho Je., Y. 2007. *Bacillus thuringiensis* as a Specific, Safe, and Effective Tool for Insect Pest Control. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17(4): 547-559.

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

Krieg, A., Huger, A., Langenbruch, G., and Schnetter W. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: A new pathotype effective against larvae of coleoptera. *J. Appl. Entomol.* 96:500-508.

Lacey, L.A., and Undeen, A.H. 1986. Microbial control of black flies and mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* 31:265-296.

Lee, M.K., Young, B.A., Dean D.H., 1995. Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different Gypsy moth midgut receptors. *Biochem. And Biophys. Research Comm.* 216: 306-312.

Li, J., Carrol, J., and Ellar, D.J. 1991 Crystal Structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature.* 353: 815-821.  
Macaluso, A., Mettus, A.M. 1991. Efficient transformation of *Bacillus thuringiensis* requires non-methylated plasmid DNA. *J. Bacteriol.* 173(3):1353-1356.

Liu, X.S., Dean, D.H. 2006. Redesigning *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin into a mosquito toxin. *Protein Eng. Des. Sel.* 19(3):107-11.

Liu, Y.L., Wang, Q.Y., Wang, F.X., Ding, X.Z., Xia, L.Q. 2010. Residue 544 in domain III of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin is involved in protein structure stability. *Protein J.* 29(6):440-444.

Lu, Y., Tang, Y., Zhang, Y., Xia, L., Wang, F., Ding, X., Yi, S., Li, W., Yin, J. 2011. The role of  $\beta$ 20- $\beta$ 21 loop structure in insecticidal activity of Cry1Ac toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Curr. Microbiol.* 62(2): 665-670.

de Maagd, R.A., Kwa M.S.G., Van der Klei, H., Yamamoto, T., Schipper, B., Vlak, J.J., Stiekema, W.J. Bosch, D., 1996. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin, CryIA(b) Results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and Altered Membrane Recognition. *Appl. Env. Microbiol.* 62: 1537-1543.

de Maagd, R.A., Bakker, P., Staykov, N., Dukiandjiev, S., Stiekema, W., Bosch, D. 1999. Identification of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III amino acid residues involved in insect specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(10): 4369-4374.

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

de Maagd, A.R., Bravo, A. and Crickmore, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics.* 17: 193-199.

Maroni, M., Fanetti, A.C., and Metruccio, F. 2006 Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides in agriculture. *Med Lav.* 97(2):430-7.

Marroquin, L.D., Elyassnia, D., Griffiths, J.S., Feitelson, J.S., and Aroian, R.V., 2000. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 155:1693-9.

Miranda,R., Zamudio. Z.F., and Bravo, A. 2001. Processing of Cry1Ab  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. *Insec. Biochem. And Mol. Biol.* 31:1155-1163

Monnerat, R., Martins, E., Querioz, P., Ordúz, S., Jaramillo, G., Benintende., G., Cozzi, J., Dolores Real, M., Martínez-Ramírez, A., Raussel, C., Cerón, J., Ibarra, E. J., Del Rincón Castro, C. M., Espinoza, A. M., Meza-Basso, L., Cabrera, L., Sánchez, J., Soberón, M., and Bravo, A. 2006. Genetic Variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) Populations from Latin America Is Associated with Variations in Susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry Toxins. *Appl Environ Microbiol.* 72(11):7029-35.

Morse, R.J., Yamamoto, T., Stroud, R.M.. 2001. Structure of Cry2Aa suggest an unexpected receptor binding epitope. *Structure.* 9: 409-417.

National Academy of Science. 2000. The future Role of Pesticides in US Agriculture, National Academy Press: Washington D.C., p.34.

Nicholson, M. G., 2007. Fighting the global pest problem: Preface to the special Toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for pest control. *Toxicon* 49: 413-422.

Núñez-Valdez, M., Sánchez, J., Lina, L., Güereca, L., Bravo, A. 2001. Structural and functional studies of alpha-helix 5 region from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1546(1):122-131.

Ocelotl, J., 2008. Residuos de las regiones  $\beta$ 16 y  $\beta$ 22 del dominio III de la toxina Cry1Ab involucrados en toxicidad contra *M. sexta*. Tesis de licenciatura.

Pacheco, S., Gómez, I., Arenas, I., Saab-Rincon, G., Rodríguez-Almazán, C., Gill, S.S., Bravo, A., and 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.

Padilla, C., Pardo-López, L., de la Riva, G., Gómez, I., Sánchez, J., Hernandez, G., Nuñez, M.E., Carey, M.P., Dean, D.H., Alzate, O., Soberón, M., Bravo, A. 2006. Role of tryptophan residues in toxicity of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(1): 901-907.

Pardo-López, L., Muñoz-Garay, C., Porta, H., Rodríguez-Almazán, C., Soberón, M. and Bravo, A. 2008. Strategies to improve the onsecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Toxicon.* 49(4):423-35

Parker, M.W., Pattus, F., Tucker, A.D., Tsernoglou, D. 1989. Structure of the membrane-pore-forming fragment of colicin A. *Nature.* 337:93-96.

Piggot, C. R., and Ellar, D. J., 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal toxin activity. *Microbiol. and Mol Biol. Rev.* 71: 255-281.

Rajamohan, F., Alcantara, E., Lee, M.K., Chen, X.J., Curtiss, A., Dean, D.H. 1995. Single aminoacid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryIAb delta-endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 177(9):2276-2282.

Rajamohan, F., Cotrill, J.A., Gould, F., Dean, D.H. 1996. Role of Domain II, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* CryIAb  $\delta$ -endotoxin in reversible binding and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* 271(5):2390-2396.

Rajamohan, F., Hussain, S.R., Cotrill, J., Gould, F., Dean, D.H. 1996. Mutations at domain II, loop 3, of *Bacillus thuringiensis* CryIAa and Cry1Ab  $\delta$ -endotoxins suggest loop 3 is involved in initial binding to lepidopteran midguts. *J. Biol. Chem.* 271:25220-25226.

Rajamohan, F., Lee, M.K., Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 60:1-27.

Raymond-Delpech, V., Matsuda, K., Sattelle., B.M., Rauh, J.J., Sattelle, D.B. 2005. Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invert. Neurosci.* 5 (3-4):119-133

Sayyed, A.H, Gatsi, R., Ibiza-Palacios, M.S., Escriche, B., Wright, D.J., Crickmore, N. 2005. Common, but complex, mode of resistance of *Plutella xylostella* to *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ab and Cry1Ac. *Appl Environ Microbiol.* 71(11):6863-9.

Schenpf, E., Tomczak, K., Ortega, J.P., Whiteley, H.R. 1990. Specificity-determining regions of a lepidopteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 265(34):20293-20930.

Schenfp, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson., J., Zeilger, D.R., and Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. and Mol Biol. Rev.* 62: 775-806.

Seale, J.W. 2006. The role of a conserved histidine-tyrosine interhelical interaction in the ion channel domain of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. *Proteins.* 63(2):385-390.

Shan, S., Zhang, Y., Ding, X., Hu, S., Sun, Y., Yu, Z., Liu, S., Zhu, Z., Xia, L. 2011. A Cry1Ac toxin variant generated by directed evolution has enhanced toxicity against Lepidopteran insects. *Curr. Microbiol.* 62(2):358-65.

Shelton, A.M., Zhao. J.Z. and Roush, R.T. 2002 Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. : *Annu Rev Entomol.* 47:845-81.

Singh, P.K., Kumar, M., Chaturvedi, C.P., Yadav, D., Tuli, R. 2004. Development of hybrid delta-endotoxin and its expression in tobacco and cotton for control of a polyphagous pest *Spodoptera litura*. *Transgenic. Res.* 13(5): 397-410.

Siqueira, H., Nickerson, K., Mollenbeck, D., and Siegfried, B. D. 2004. Activity of gut proteinases from Cry1Ab-selected colonies of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Pest Manag. Sci.* 60: 1189-1196.

Smedley, D.P., Ellar, D.J. 1996. Mutagenesis of three surface-exposed loops of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin reveals residues important for toxicity, receptor recognition and possibly membrane insertion. *Microbiol.* 142:1617-1624.

Soberón, M. Bravo, A., 2008. Una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología de la UNAM 25 aniversario, Capítulo 27: Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: Modo de Acción y consecuencias de su aplicación. pp 303-314

Srinivasan, R. 2008. Susceptibility of legume pod borer (LPB), *Maruca vitrata* to delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* (Bt) in Taiwan. *J Invertebr Pathol.* 97(1):79-81.

Steinhaus, E.A. 1951. Possible use of *B.t. berliner* as an aid in the control of alfalfa caterpillar. *Hilgardia* 20: 359-381.

Vachon, V., Préfontaine, G., Coux, F., Rang, C., Marceau, L., Masson, L., Brousseau, R., Frutos, R., Schwartz, J.L., Laprade, R. 2002. Role of Helix 3 in pore formation by the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. *Biochem.* 41:6178-6184.  
Vachon, V., Préfontaine, G., Rang, C., Coux, F., Juteau, M., Schwartz, J.L., Brousseau, R., Frutos, R., Laprade, R., Masson, L. 2004. Helix 4 mutants of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa display altered pore-forming abilities. *Appl. Environ. Microbiol.* (10):6123-6130.

Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., Van Mellaert, H. 1990. Receptor on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(5):1378-1385.



Wei, J., Hale, K., Carta, L., Platzer, E., Wong, C., Fang, S.C., Aroian, R.V., 2003. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 100: 2760-2765

Wheeler, W.B., 2002. Role of Research and regulation in 50 Years of Pest Management in Agriculture. J Agric. Food. Chem. 50(15):4151-5.

Xiang, W.F., Qiu, X.L., Zhi, D.X., Min, Z.X., Yuan, L., Quan, Y.Z. 2009. N546 in beta18-beta19 loop is important for binding and toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. J. Invertebr. Pathol. 101(2):119-23