



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DEL FRAGMENTO DE PROTOXINA C  
TERMINAL DE CRY1AB(C)MOD EN SU SOLUBILIDAD Y TOXICIDAD**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias**

**PRESENTA:  
Q. FRANCISCA VILLANUEVA FLORES**

**TUTOR PRINCIPAL: DR. MARIO SOBERÓN CHÁVEZ  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA-UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR Y ENTIDAD O INSTITUCIÓN DE  
ADSCRIPCIÓN  
DR. ERNESTO ORTÍZ SURÍ  
DRA. CARMEN BELTRÁN NUÑEZ  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA-UNAM**

**CUERNAVACA, MORELOS. ABRIL, 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

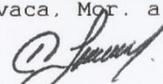
Q. FRANCISCA VILLANUEVA FLORES

Por este conducto me permito informarle que la Comisión Académica acordó asignarle el siguiente jurado de examen para obtener el grado de Maestra en Ciencias.

Presidente	Dr.	Baltazar Becerril Luján
Secretario	Dra.	Katy Juárez López
Vocal	Dr.	Humberto Lanz Mendoza
Vocal	Dr.	Ricardo Oropeza Navarro
Vocal	Dr.	Humberto Flores Soto

Sin más por el momento me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuernavaca, Mor. a 22 de abril de 2014

  
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz  
Coordinadora de Docencia

En un plazo máximo de **tres semanas**, contados a partir del momento en que el sinodal designado oficialmente reciba la tesis, éste deberá dar su voto fundamentado por escrito, el cual será comunicado al comité académico. Si considera que le será imposible cumplir con esta obligación deberá indicarlo al alumno para ser sustituido de inmediato.





El presente trabajo fue realizado en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (**UNAM**) con financiamiento del donativo **PAPIIT IN201515** y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**).

Se agradece especialmente el valioso apoyo técnico de la **Dra. Blanca Inés García Gómez**, cuya participación enriqueció ampliamente el trabajo.



## **Dedicatoria**

*A mis dos inmortales pilares:*

*Dios*

*y*

*Mi madre*

*Si caminas solo irás más rápido,  
si caminas acompañado llegarás más lejos.*

**(Proverbio chino)**

...Yo elegí llegar más lejos



## **Agradecimientos**

A **Dios**, porque cuando creí que iba caminando sola al ver sólo dos huellas en la arena, era porque él me llevaba en brazos.

Al **Dr. Mario Soberón Chávez** por abrirme las puertas en su laboratorio, por su apoyo incondicional en los momentos más críticos y por mostrar al extraordinario ser humano que existe detrás del gran investigador. Lo aprecio mucho doc.

A todos mis compañeros de laboratorio la **Dra. Isabel, la Dra. Ale, Chelita, Violeta, Josué, Meztli, Danny, Dianita, Leivi, Gina, Arlén, Zefe, Emi, Checo, Dr. Sabino, el Dr. Carlos**. Particularmente a la **Dra. Gretel**, quien se convirtió en mi mejor amiga y confidente, estoy segura de que nuestra amistad perdurará para siempre. A **Fer Zúñiga** por todos los lindos detalles que tuviste conmigo. Especialmente quiero agradecer a la **Dra. Blanca** por convertirse en maestra, amiga y sobretodo en EJEMPLO. A ella, quien con paciencia, dedicación me enseñó a trabajar y me mostró que la ciencia no está peleada con la realización personal, calidez y sencillez humana. Espero ser algún día una investigadora con tu sabiduría para saber balancear ambas cosas. Esa fue sin duda la mejor de tus lecciones.

A **Miguel Ángel**, mi mejor amigo de toda la vida, quien en el nombre lleva el oficio. Gracias porque a pesar del tiempo y la distancia siempre estás ahí para no olvidar quién soy, de donde vengo y hacia dónde vamos.

Pero muy especialmente a mi madre, **Lucía**, el ser más puro y santo de mi vida. Cuando nací, me diste tu mano un me enseñaste a caminar, ahora que crecí me diste alas y me enseñaste a volar. La lección más importante de mi vida, aquella que no se aprende en los libros, me la das cada día con tus muestras infinitas de amor. Sin ti no soy nada, y contigo lo soy y tengo todo.



## **1.0 Contenido**

<b>Agradecimientos</b> .....	5
3.0 Introducción .....	10
3.1 Mecanismo de acción de las toxinas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> : generalidades .....	11
3.2 Resistencia asociada al uso de toxinas Cry.....	15
3.3 Estrategias para contender la resistencia en insectos a la acción de las toxinas Cry .....	20
3.3.1 Uso de refugios.....	21
3.3.2 Efectos aditivos de la toxicidad de las proteínas de Bt .....	21
3.3.3 Ingeniería de proteínas .....	21
4.0 Antecedentes .....	23
5.0 Hipótesis.....	27
6.0 Objetivo General .....	28
7.0 Materiales y métodos .....	29
7.1 Construcción de las toxinas quimeras Cry1AbMod/Cry1C y Cry1AcMod/Cry1C .....	29
7.2 Amplificación de la toxina modificada Cry1CMod .....	30
7.3 Clonación de la quimera Cry1AbMod/Cry1C y Cry1CMod en el vector pJET de <i>E. coli</i> .....	32
7.4 Caracterización de las quimera Cry1AbMod/Cry1C y Cry1CMod clonadas en pJET de <i>E. coli</i> .....	32
7.5 Clonación de Cry1CMod y las quimeras Cry1AbMod/Cry1C y Cry1AcMod/Cry1C bajo el promotor de Cry3A en el vector pHT315 .....	33
7.6 Caracterización de Cry1CMod y las quimeras p3A-Cry1Ab(c)Mod/Cry1C en <i>E. coli</i> .....	34
7.7 Clonación de Cry1CMod y las quimeras p3A-Cry1Ab(c)Mod en <i>Bt</i> .....	34
7.8 Caracterización de la transformación en <i>Bt</i> de Cry1CMod y las quimeras p3A-Cry1Ab(c)Mod en <i>Bt</i> .....	35
7.9 Obtención y solubilización de espóra-cristal de Cry1CMod y las quimeras p3A-Cry1Ab(c)Mod .....	35
7.10 Bioensayos.....	36
8.0 Resultados .....	37
8.1 Construcción de los genes que codifican para las proteínas quimeras p3A-Cry1Ab(c)Mod y la proteína no quimera p3A-Cry1CMod.....	37
8.2 Clonación de los genes que codifican para las proteínas quimeras p3A-Cry1Ab(c)Mod y la proteína no quimera Cry1CMod en <i>E. coli</i> . .....	39



8.3 Expresión y solubilización de Cry1CMod y de las quimeras p3A-Cry1AbMod/Cry1C y p3A-Cry1AcMod/Cry1 C en <i>Bt</i> .....	41
8.4 Análisis de la toxicidad de Cry1CMod y de las quimeras p3A-Cry1AbMod/Cry1C y p3A-Cry1AcMod/Cry1C.....	43
8.5 Resumen de resultados .....	44
10.0 Conclusiones.....	51
11.0 Anexos .....	52
11.1 Anexo 1: Oligonucleótidos utilizados .....	52
11.2 Anexo 2: Plásmidos utilizados .....	55
11.0 Referencias.....	56



## **2.0 Resumen**

Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt) son el biopesticida más usado en el mundo, sin embargo en las últimas décadas la aparición de insectos resistentes en campo ha puesto en riesgo el uso de esta tecnología. Para contender contra la resistencia, en nuestro grupo de trabajo se han generado toxinas mutantes (CryMods) capaces de matar insectos resistentes. No obstante, el proceso es metodológicamente complicado pues existe una selección negativa para mantener la integridad del gen. Esto se puede deber a la expresión fuga del gen cuyo producto proteico es tóxico para las transformantes de *Escherichia coli* (*E. coli*), lo que ocasiona rearrreglos en los genes que codifican para las toxinas modificadas. Por tal motivo se cambió su promotor nativo por el de Cry3A, que se expresa en Bt, pero no en *E. coli*. Sin embargo las proteínas que se producían bajo este promotor resultaron insolubles y no tóxicas.

Se sabe que, los puentes disulfuro establecidos entre las cisteínas contenidas en la porción C terminal de las protoxinas Cry están directamente relacionados con la formación del cristal proteico, así como con las propiedades de solubilidad.

Por tanto en el presente trabajo se reemplazó la región C terminal de las protoxinas Cry1AbMod y Cry1AcMod por la de Cry1C. Las quimeras resultantes fueron solubles a pH 10.5, similar al del intestino de la larva. Asimismo se evaluó la toxicidad (mortalidad) de las tres construcciones en larvas de *Spodoptera frugiperda* (*S. frugiperda*), denotando que el reemplazo de la región C terminal de protoxina, hace que tanto Cry1AbMod como Cry1AcMod recobren la toxicidad que perdían por ser insolubles al expresarse bajo el promotor de Cry3A.

Cabe resaltar que la forma de cristalización se afectó en las quimeras, pues ambas formaron inclusiones cristalinas irregulares y pequeñas, en lugar de la clásica forma bipyramidal que caracteriza a la familia de las toxinas Cry1.



Por otra parte también se construyó la proteína Cry1CMod no quimérica, la cual bajo el promotor de Cry3A fue soluble, pero en contraste con las quimeras, ésta si era capaz de formar cristales bipiramidales.

Nuestros resultados abren la puerta a futuros trabajos enfocados en la generación de nuevas toxinas CryMods que al estar expresadas bajo el promotor de Cry3A, no generen rearreglos en *E. coli*, que sean solubles a pH 10.5 (similar al del intestino de la larva) y potencialmente, con propiedades insecticidas mejoradas.



### **3.0 Introducción**

La agricultura es una actividad económica importante. En México, según los datos del banco mundial alrededor del 13% de la totalidad del territorio nacional está dedicado a ella. Hoy en día, el campo mexicano enfrenta varios retos, principalmente el mantenimiento de su autonomía alimentaria, es decir, que nuestros campos garanticen la satisfacción de las necesidades alimenticias de la población. Para hacer sustentable este modelo, uno de los principales problemas a resolver es el control de plagas, pues según datos de la FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), las pérdidas en la producción agrícola mundial causadas por diferentes plagas fluctúan entre 20% y 40% [1].

Tradicionalmente el combate de plagas agrícolas se ha llevado a cabo mediante agentes químicos, los cuales son problemáticos debido a su posible impacto negativo en la salud pública y a los efectos secundarios sobre el medio ambiente [2-4].

Una alternativa sustentable para contender contra las plagas es el uso de control biológico, principalmente aquel basado en la aplicación de toxinas Cry (del inglés crystal) de *Bacillus thuringiensis* (Bt) [5]. Las toxinas de Bt son los biopesticidas más populares en el mundo y se utilizan para controlar diversos insectos que afectan la agricultura, la actividad forestal y la propagación de insectos vectores que transmiten patógenos a humanos y animales. Entre las ventajas que ofrece esta tecnología respecto al uso de pesticidas químicos es que son inocuas para el hombre y animales [6, 7], son biodegradables, son tóxicas ante diferentes órdenes de insectos como coleóptera, díptera, himenóptera, homóptera, ortóptera, malófaga, lepidóptera, mosquitos y también ante nemátodos [8], mientras que al mismo tiempo poseen una elevada toxicidad selectiva para diversas especies [9, 10].



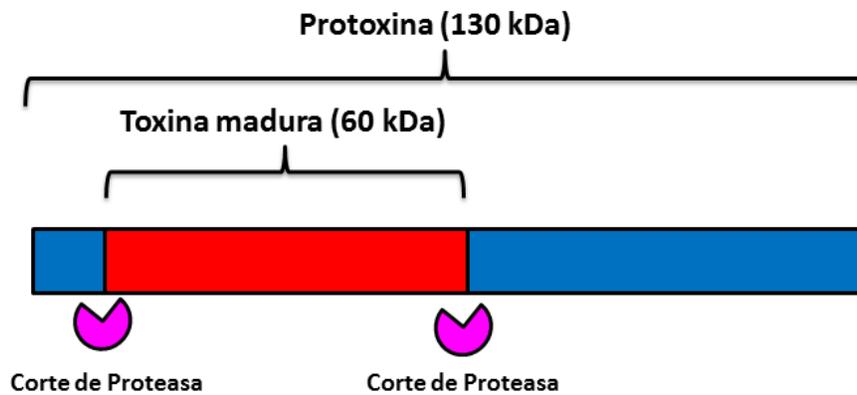
Sin embargo, uno de los inconvenientes más importantes de esta tecnología es la aparición de insectos resistentes debido a la presión selectiva. Es por ello que desarrollar nuevas tecnologías que capaces de contender contra la resistencia a las toxinas Cry, constituye en sí mismo uno de los principales retos que enfrentan los biotecnólogos en esta área. Para esto es necesario comprender los mecanismos de resistencia para poder diseñar estrategias capaces de combatirla. Así, es fundamental conocer el mecanismo de acción de las toxinas Cry, el cual se abordará en las secciones ulteriores.

### **3.1 Mecanismo de acción de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: generalidades**

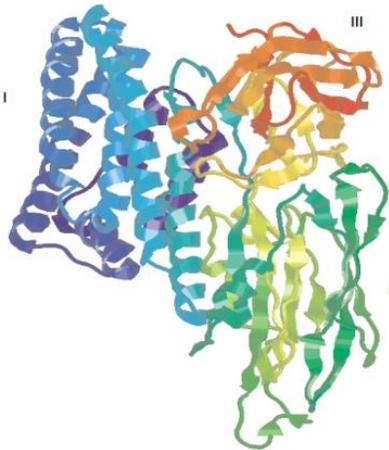
Las toxinas Cry, también llamadas  $\delta$ -endotoxinas, son proteínas cristalinas producidas durante la fase de esporulación de Bt, las cuales por sus propiedades entomopatógenas, son ampliamente usadas en el control de plagas en la agricultura [5].

Las toxinas Cry se clasifican con base en su secuencia de aminoácidos en 72 grupos (Cry1-Cry72) [11]. Estas secuencias génicas se han clasificado en al menos 4 familias, la más extensa de ellas es la familia de 3 dominios (3D) cuya estructura, (aunque no su secuencia), se encuentra altamente conservada [5]. Particularmente las protoxinas de la familia Cry1A, forma cristales bipiramidales de 120-140 kDa.

El mecanismo de acción de las toxinas Cry ha sido ampliamente estudiado y se ha descrito principalmente en lepidópteros. La mayoría de las toxinas Cry son activas principalmente en el estado larvario del insecto blanco. Primeramente, los cristales de *Bt* se ingieren por el insecto y luego se solubilizan debido al pH 10-11 presente en el intestino de la larva. Posteriormente la protoxina se procesa por proteasas intestinales, liberando el fragmento tóxico activo de 60 KDa (figura 1) compuesto por los tres dominios estructurales, lo cuales se muestran en la figura 2.



**Figura 1.** Ilustración de la estructura general de una protoxina típica Cry1A. La protoxina (región azul y roja) la cual tiene un tamaño aproximado de 130 kDa. Las figuras en rosa representan las proteasas intestinales que escinden el fragmento tóxico de 60 kDa.



**Figura 2.** Estructura cristalográfica de la toxina madura Cry1A (PDB: 1CIY). Se muestra el modelo de listones los tres dominios con distintos colores. Tomado de [12].

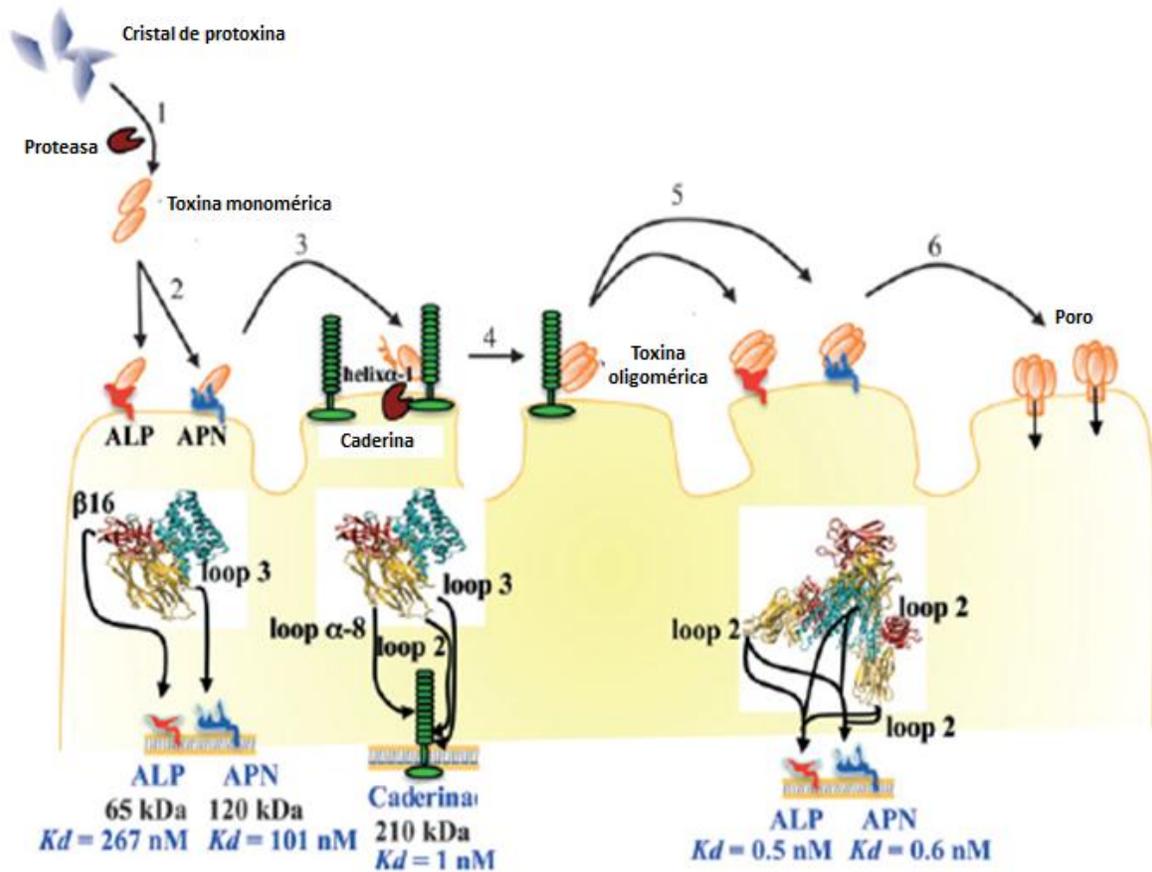
El dominio I, está conformado por un ramillete de 7 hélices  $\alpha$ , está implicado en la inserción en la membrana, la oligomerización de la toxina y la formación del poro lítico. El



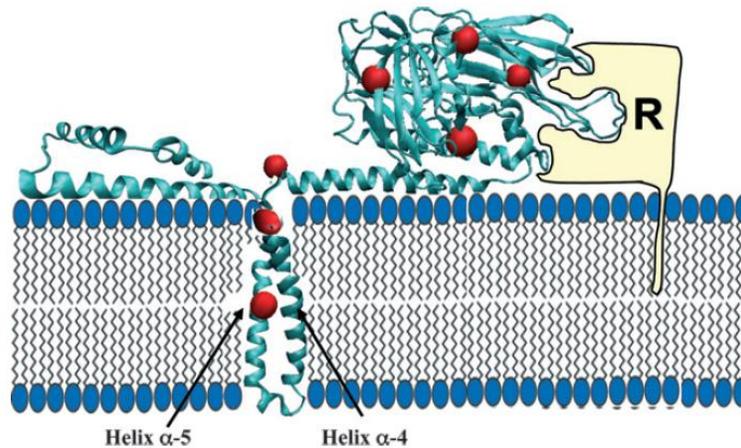
dominio II es un prisma beta conformado por tres hojas  $\beta$  antiparalelas empacadas alrededor de un núcleo hidrofóbico con asas expuestas involucradas en el reconocimiento de los receptores. Finalmente el dominio III es un sándwich  $\beta$  formado por 2 hojas  $\beta$  antiparalelas. Tanto los dominios II y III están implicados en la especificidad contra insectos mediante interacciones con determinadas proteínas del intestino del insecto [13].

Una vez activada la toxina, el modelo de formación de poro propone que ésta se une con baja afinidad a los receptores anclados a GPI alcalino fosfatasa (ALP) y aminopeptidasa (APN), los cuales son muy abundantes [14, 15]. Posteriormente la toxina se une con alta afinidad al receptor caderina. Esta última unión facilita el corte proteolítico del N-terminal incluyendo el asa I del dominio I, lo que induce la formación de un oligómero pre-poro [16, 17]. El oligómero se une nuevamente con las moléculas ALP y APN con alta afinidad. Finalmente la unión a los receptores ALP y APN facilitan que el oligómero se inserte en la membrana ocasionando la formación del poro que acarrea un desequilibrio osmótico que conduce finalmente a la lisis celular (figura 3) [18].

El modelo más aceptado de inserción en la membrana de las toxinas Cry consiste en que las horquillas hidrofóbicas formadas por las hélices  $\alpha$ -4 y  $\alpha$ -5 se insertan en la membrana, mientras que el resto de las hélices anfipáticas del dominio I se extienden en la superficie membranal a modo de sombrilla (figura 4) [19-21]. Esto es congruente con el mecanismo de inserción de otras toxinas formadoras de poro como aerolisina,  $\alpha$ -hemolisina, ántrax o citolisinas dependientes de colesterol (CDC), que se insertan en la membrana sólo una pequeña porción de la proteína, mientras que el resto permanece fuera [22].



**Figura 3.** Modo de acción a nivel molecular de las toxinas Cry1A en el lepidóptero, *Manduca sexta*. 1) La protoxina se solubiliza y se proteoliza en el intestino del insecto. 2) La toxina se une en forma monomérica a los receptores aminopeptidasa-N anclados a GPI y alcalino fosfatasa. 3) El monómero de Cry1A se une al receptor de caderina, lo que facilita el corte proteolítico de la hélice  $\alpha$ -1 y parte de la  $\alpha$ -2 del dominio I. 4) La toxina oligomeriza y puede unirse nuevamente a los receptores aminopeptidasa-N anclados a GPI y alcalino fosfatasa. 5) La toxina se inserta como oligómero en la membrana y sobreviene una lisis osmótica para el insecto hospedero. En la parte inferior de esquema se encuentran representadas las zonas específicas de interacción con los receptores, así como las afinidades correspondientes. Modificado de [23]



**Figura 4.** Modelo de sombrilla para la inserción en la membrana de las toxinas Cry de Bt. Los residuos resaltados en rojo, fueron sustituidos por cisteína por Zavala y colaboradores (2011), demostrando que solo los residuos T122 y V171 se enterraron en la membrana durante la inserción. En la figura “R” representa un receptor. Tomado de [23].

### 3.2 Resistencia asociada al uso de toxinas Cry

En 1901 el investigador japonés Ishiwata descubrió a Bt. Para 1920 los agricultores solían usar Bt como pesticida, pero no fue sino hasta 1938, en Francia, que se comenzó a comercializar en formulaciones base espora llamada “Sporine” para matar a las polillas de la harina. 20 años después, se extendió la comercialización de esporas de Bt en Estados Unidos y en 1961 tras ser aprobado por la EPA, el uso de productos en aerosol derivados de espora de Bt se extendió notablemente. No obstante, estas formulaciones tenían múltiples desventajas que impidieron su popularización pues se diluían con la lluvia, se degradaban ante la radiación UV del sol y no eran eficaces contra determinados insectos, por ejemplo los que se desarrollaban en el subsuelo o dentro de la planta. Para la década de los 90’s estos inconvenientes fueron subsanados por los avances en ingeniería genética, al hacer posible transfectar plantas con el gen de la toxina. A partir de entonces,



muchos cultivos de interés comercial han sido genéticamente modificados y distribuidos alrededor del mundo entre los que destacan el maíz y el algodón [24]. Sin embargo, con el auge de esta tecnología sobrevino la gran desventaja de que diversas especies de insectos en campo, dada la presión selectiva, se seleccionaron variedades de insectos resistentes hacia las toxinas de Bt [25].

La resistencia es un fenómeno evolutivo que involucra cambios en las frecuencias de alelos de genes específicos en el tiempo [26]. En teoría, la resistencia a las toxinas Cry, puede suscitarse al bloquear cualquiera de las etapas del mecanismo de acción descritos en la figura 3 [23].

Actualmente, la aparición de resistencia a las toxinas Cry, supone un riesgo latente para el uso de esta tecnología. A la fecha, se han reportado casos de aparición de resistencia en diferentes lepidópteros de campo en países como India, China, Australia, Estados Unidos y Puerto Rico. En la tabla 1 se describen diversas especies de insectos en las que se han reportado con resistencia en campo o en laboratorio y el mecanismo de resistencia asociado.

**Tabla 1.** Insectos resistentes a toxinas Cry de Bt.

<b>Especie</b>	<b>Cultivo que afecta</b>	<b>Toxina a la que es resistente (r) o tolerante (t)</b>	<b>Detección de resistencia</b>	<b>Mecanismo de resistencia</b>	<b>Referencia</b>
<i>Diatraea saccharalis</i>	Maíz, sorgo y caña	Cry1Ab (r)	Campo (US)	Desconocido	[27, 28]
<i>Ephestia</i>	Harina	Cry1A y Cry2A (t)	Laboratorio	Sobreproducción	[28, 29]



<i>kuehniella</i>	almacenada			de lipoforina	
<i>Helicoverpa armígera</i>	Algodón, frijol maíz y sorgo.	Cy1Ac (r) y Cry1Fa (r)	Campo y laboratorio (India, China, Australia)	Sobreproducción de esterases y hexamerina. Falta del receptor de caderina	[30-37]
<i>Helicoverpa zea</i>	Maíz, algodón, tabaco y tomate	Cry1Ac (r), Cry2Ab	Campo (Australia) y laboratorio.	Relacionado con la unión a receptor alcalino fosfatasa en el caso de Cry1Ac, en una línea resistente seleccionada en laboratorio.	[38, 39]
<i>Heliothis virescens</i>	Algodón, maíz, tomate.	Cry1Ac y Cry2A (r)	Laboratorio	Falta del receptor de caderina y alcalino fosfatasa. Mutaciones en el transportador ABC.	[40-46]

*Análisis de la participación del fragmento de protoxina C terminal de  
Cry1Ab(c)Mod en su solubilidad y toxicidad*



<i>Pectinophora gossypiella</i>	Algodón	Cry1Ac y Cry1Ab (r)	Campo (India)	Desconocido	[47]
<i>Plodia interpunctella</i>	Harina y nueces	Bt subsp. <i>entomocidus</i> (r)	Laboratorio	Defectos en las proteasas intestinales	[48]
<i>Plutella xylostella</i>	<i>Brassicae, cruciferae</i>	Cry1Ac y Cry1Ab (r)	Campo (USA)	Transportador ABC	[49-51]
<i>Spodoptera exigua</i>	Remolacha azucarera, algodón y tomate	Cry1C (r)	Laboratorio	Falta de aminopeptidasa 1	[52]
<i>Trichoplusia ni</i>	<i>Brassicae, cruciferae</i>	Cry1Ac (r)	Campo	Transportador ABC y expresión APN	[53, 54]
<i>Ostrinia nubilalis</i>	Maíz	Cry1Ab (r)	Campo (USA)	Desconocido	[55]
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Maíz	Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1F.	Campo (Puerto Rico)	Reducción ALP	[37, 56]

---

Modificado de [57]

---



Por otra parte, Heckel y colaboradores [26] han propuesto, en relación a la generación de resistencia, que si bien la toxicidad de las proteínas Cry está condicionada a la combinación de múltiples factores como el tipo de toxina, las condiciones fisicoquímicas del lumen intestinal del insecto, la acción de proteasas que influyen tanto en la solubilidad de la toxina como en su procesamiento y los diferentes receptores en los insectos, es posible identificar varios mecanismos de resistencia, lo cuales hemos agrupado con base en los diferentes estadios de intoxicación, enunciados en la tabla 2 [26].

**Tabla 2.** Posibles mecanismos de resistencia a las toxinas Cry en los insectos según la etapa de intoxicación.

<b>Etapa</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Referencia</b>
Pre-proteólisis	Inhibición de la germinación de esporas de Bt. Insolubilidad de la espora cristal que evita su paso a la matriz peritrófica y resulta en su eventual excreción	[26, 58]
Proteólisis intestinal	No se forma toxina activa por fallo en el procesamiento de la protoxina. Degradación de las toxinas por una alta actividad de las proteasas de la plantas transgénicas u otros	[58, 59]



	insectos.	
Inactivación física en el intestino y respuesta inmune	Precipitación Coagulación Toxina que queda atrapada en la matriz peritrófica.	[26, 36, 60]
Interacción con los receptores	Modificación de los receptores que reducen o abaten la unión irreversible con la toxina. Niveles reducidos del receptor fosfatasa alcalina.	[37, 46, 61-63]
Alteraciones en el poro	Interferencia en la formación del poro. Poros obstruidos. Reemplazo de las células muertas del intestino por una alta actividad de las células madre.	[37, 63-65]

---

Tabla basada en la revisión [26]

---

### **3.3 Estrategias para contener la resistencia en insectos a la acción de las toxinas Cry**

Para contener contra la aparición de resistencia en insectos en campo hacia la acción de las toxinas Cry, se han seguido diversas estrategias, las cuales se describen a continuación.



### **3.3.1 Uso de refugios**

Los refugios son metodologías de siembra de cultivos no modificados con Bt para que algunos insectos no resistentes (homocigóticos) puedan sobrevivir y mantener así una población vulnerable a la toxina. Esta técnica se basa en la suposición de que los genes de resistencia a las toxinas Cry son de carácter recesivo y que los cultivos Bt son capaces de controlar tanto a los insectos susceptibles (*SS*) como a los heterocigotos portadores de resistencia (*RS*). De esta manera, si surgieran insectos homocigotos resistentes (*RR*), éstos podrían cruzarse con los sensibles (*SS*) en la zona del refugio (plantas susceptibles no transgénicas), dando origen a más insectos *RS*, los que serían eliminados en el cultivo Bt. Como consecuencia, la frecuencia de los genes resistentes en la población será baja [66].

### **3.3.2 Efectos aditivos de la toxicidad de las proteínas de Bt**

Con el fin de contender contra la resistencia a las toxinas Cry, se han aprovechado los efectos aditivos de la toxicidad de diferentes Cry [67, 68]. Por ejemplo en el uso de cepas recombinantes que expresan 2 (o más) toxinas Cry, o bien que expresen una toxina Cry y otro gen distinto (como *vip*, del inglés vegetative insecticidal proteins), los cuales son reconocidos por al menos un receptor distinto y es capaz de matar a los insectos que antes eran resistentes [69].

Respecto a trabajos con plantas transgénicas, se ha logrado expresar simultáneamente dos diferentes toxinas (Cry1Ac y Cry2A) en el algodón Bollgard II patentado por Monsanto [69]. Estos avances han logrado no sólo contender contra la resistencia de los insectos, sino por un efecto aditivo, se ha visto que se incrementa la toxicidad [69].

### **3.3.3 Ingeniería de proteínas**



Pocos trabajos de ingeniería de proteínas se han llevado a cabo con éxito para contener contra la resistencia de insectos a las toxinas Cry.

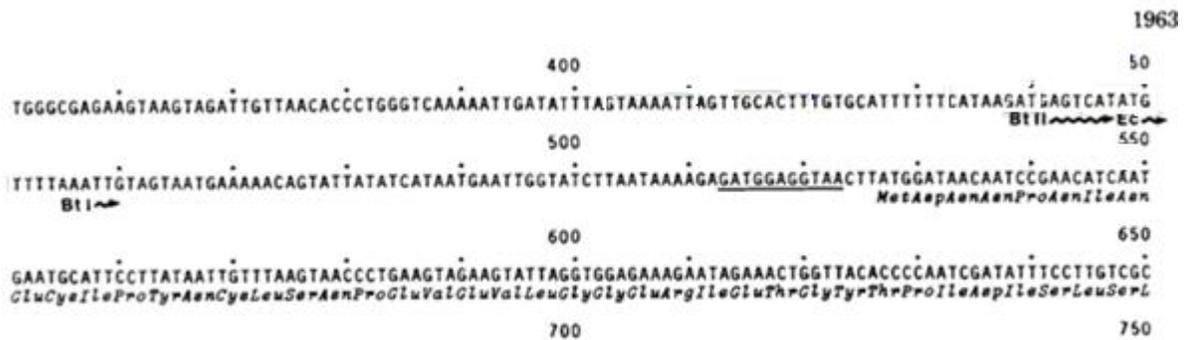
Un ejemplo de ello son los cultivos de maíz transgénicos SmartStax (Monsanto, MI y DowAgroSciences, IN) los cuales son resistentes a varios tipos de plaga y dado que poseen toxinas con diferente modo de acción, poseen una baja tasa de aparición de resistencia en campo. El maíz SmartStax, expresan la toxina Cry1F, Cry2Ab y Cry1Ab10.5 (una toxina híbrida que contiene el dominio I y el dominio II de la proteína Cry1Ab; el dominio III de Cry1F y la región C-terminal de Cry1Ac), así como dos toxinas Cry activas contra coléopteros (Cry34Ab y Cry3Bb).

Es importante resaltar que de todos los mecanismos de resistencia, el más común en lepidópteros es el asociado a mutaciones que afectan la unión a los receptores de membranas, como es la caderina. En este sentido, otro ejemplo notable de ingeniería de toxinas Cry, es el realizado por Soberón y colaboradores, quienes modificaron la toxina Cry1A, escindiendo la hélice  $\alpha 1$  y la mitad de la  $\alpha 2$  del dominio 1, lo que le confirió la capacidad de formar oligómero en ausencia del receptor de caderina [70]. Estudios posteriores demostraron que dichas toxinas modificadas exhibieron toxicidad hacia diferentes especies de insectos lepidópteros independientemente de que tuvieran mutaciones en el gen de caderina, además de que la toxicidad relativa de las toxinas modificadas es más alta en las cepas resistentes con respecto a las susceptibles [70, 71]. Gómez y colaboradores demostraron que la pérdida de potencia ante insectos susceptibles se atribuye a que Cry1AbMod es capaz de oligomerizar, mas no así como toxina activada [83].



#### 4.0 Antecedentes

La obtención de las toxinas Cry modificadas obtenidas por Soberón y colaboradores capaces de contender contra la resistencia en insectos, es un proceso complicado metodológicamente, pues se ha observado que las transformantes de *E. coli*, es decir aquellas bacterias resultantes de la incorporación y expresión de material genético exógeno, exhiben rearrreglos en el DNA, lo que podría apuntar a que las toxinas expresadas sean tóxicas para la célula. Esto posiblemente pueda atribuirse a que el promotor nativo de Cry1A, posee un sitio de inicio para la transcripción en *E. coli*, el cual podría generar cierta expresión de fuga en *E. coli*.



**Figura 5.** Secuencia nucleotídica del promotor de las toxinas Cry1A presente en las construcciones p1-Cry1AbMod y p1-Cry1AcMod. Nótese que para Bt existen dos sitios de inicio de la transcripción. Asimismo en este promotor fue mapeado un sitio de inicio para la transcripción en *E. coli*. Tomado de [72]

Por tanto García-Gómez y colaboradores cambiaron el promotor natural de las variantes de Cry1A, por el promotor de Cry3A (figura 6), ya que éste no se expresa en *E. coli*, pero si en *Bt* como lo sugieren datos con la toxina Cry2Ab [73, 74]. Además el promotor de Cry3A está controlado por un factor sigma diferente ( $\sigma_A$ ) regulado al inicio de la fase estacionaria y es independiente de los factores de esporulación ( $\sigma$ ). De modo que, al eliminar la competencia por los factores  $\sigma$ , la expresión de las toxinas Cry es más eficiente



[73]. No obstante, si bien la toxina Cry1AbMod se expresa correctamente bajo el promotor de Cry3A, la proteína que se produce es insoluble y no es tóxica hacia larvas de *Plutella xylostella* (*P. xillostella*) [75]. Lo anterior, se ha hipotetizado que se debe a que el promotor de Cry3A está regulado en una fase más temprana (inicio de la fase estacionaria) con respecto al promotor nativo de Cry1As (fase de esporulación) y esta diferencia temporal, posiblemente ocasione un plegamiento incorrecto en la proteína volviéndola insoluble.



**Figura 6.** Secuencia del inicio del promotor de Cry3A STAB-SD marca el sitio de estabilización del complejo ribosomal y RBS el sitio de unión a ribosomas..

En síntesis, el cambio del promotor nativo por el Cry3A permitió la clonación de los genes que codifican para las toxinas CryMod en *E. coli*, sin que éstas presenten rearrreglos



moleculares. Y no obstante que proteínas fueron insolubles al expresarse en Bt, se siguió trabajando con este promotor.

Con la finalidad de solventar el problema de la insolubilidad en las CryMods que conllevó el cambio del promotor nativo de las Cry1As por el de Cry3A, se decidió explorar la posibilidad de que modificaciones en la región C terminal de la protoxina pudieran mejorar las propiedades de solubilidad de las construcciones modificadas, bajo los fundamentos que a continuación se mencionan.

Por un lado, se sabe que la solubilidad de las toxinas Cry está directamente relacionada con sus propiedades entomopatógenas [76], debido a que si una toxina es insoluble al pH alcalino del intestino del insecto, ésta es incapaz de participar en el mecanismo de acción que conlleva a la muerte del blanco. Esta capacidad de solubilización está determinada por el arreglo de los puentes disulfuro establecidos entre las cisteínas presentes en la región de protoxina tanto N terminal como C terminal, las cuales determinan la formación del cristal proteico [77]. Por lo tanto, se requiere cierto arreglo entre los puentes disulfuro de la misma para que la toxina sea capaz de solubilizarse [78] y en consecuencia ser tóxica.

En el 2011, Peng y colaboradores, demostraron que el cambio de una única cisteína por serina en la protoxina Cry7Ba1 (C834S) ( $LC_{50}$  3.07 (2.20–4.98)) ng/mL es capaz de conferirle tanto solubilidad como toxicidad hacia el *P. xylostella* [79].

Con base en ello, con objeto de mejorar las propiedades de solubilidad, recientemente en nuestro grupo de trabajo, mediante mutagénesis sitio dirigida se construyeron 6 mutantes en las que las 6 cisteínas de la región de protoxina C terminal se mutagenizaron por serinas tanto para Cry1AbMod como para Cry1AcMod expresadas bajo el promotor de Cry3A, (p3A-Cry1Ab(c)Mod). Interesantemente, las mutantes p3A-Cry1AbMod C654S ( $LC_{50}$  29.3 (23.1–36.4)) ng/mL y p3A-Cry1AbMod C729S ( $LC_{50}$  34.2 (28.2–41.4)) ng/mL exhibieron un fenotipo de solubilidad a pH 10.5; no obstante disminuyeron su toxicidad



hacia *P. xylostella* comparadas con Cry1AbMod expresada bajo su promotor nativo (LC<sub>50</sub> 15.5 (10.5–19.5)) ng/mL [75].

En el caso de la mutante p3A-Cry1AcMod C730S (LC<sub>50</sub> 35.8 (28.7–42.4) ng/mL, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a toxicidad hacia *P. xylostella* comparada con Cry1AcMod (LC<sub>50</sub> 35.5 (27.3–43.0)) ng/mL expresada bajo su promotor nativo [75].

En conjunto, estos resultados sugieren que la región de protoxina C-terminal, particularmente los puentes disulfuro establecidos entre las cisteínas contenidas están directamente relacionadas con las propiedades de solubilidad en las toxinas CryMods, pese a que éstas carecen del par de cisteínas presentes en la región N terminal de la protoxina [75].

Otra estrategia seguida para solubilizar la protoxina Cry7Ba planteada por Peng y colaboradores, corresponde al reemplazo completo del fragmento Cterminal de la de protoxina Cry7Ba por el de Cry1C. La proteína quimera no sólo denotó ser estable y soluble al pH fisiológico del intestino del insecto (10.5), sino que además exhibía una toxicidad hacia *P. xylostella* similar a las mutantes puntuales (LC<sub>50</sub> 4.39 (3.07–11.48)) ng/mL [79].

Con base en lo anterior, si las propiedades insecticidas de las toxinas Cry dependen de su solubilidad a pH alcalino (10.5) y la solubilidad a su vez está en función del arreglo de los puentes disulfuro en el cristal de protoxina, se plantea la siguiente hipótesis.



### **5.0 Hipótesis**

La sustitución del fragmento C terminal de la protoxina Cry1Ab(c)Mod por el de Cry1C, mejorará la solubilidad cuando éstas quimeras se expresen bajo el promotor de Cry3A.



## **6.0 Objetivo General**

Modificar la región de protoxina de la proteína Cry1AbMod y Cry1AcMod para evaluar su toxicidad (mortalidad) hacia larvas *S. frugiperda*.

## **6.1 Objetivos particulares**

1. Realizar la construcción de dos proteínas quimeras mediante el reemplazo del fragmento de protoxina C terminal de las proteínas Cry1AbMod y Cry1AcMod, por el de Cry1C.
2. Construir la proteína no quimérica Cry1CMod.
3. Expresar las proteínas anteriormente mencionadas en Bt y evaluar su solubilidad y toxicidad (mortalidad) hacia larvas de *S. frugiperda*.



## **7.0 Materiales y métodos**

### **7.1 Construcción de las toxinas quimeras Cry1AbMod/Cry1C y Cry1AcMod/Cry1C**

La extracción y purificación del DNA templado se obtuvo mediante el kit Wizard® Plus SV Minipreps de Promega atendiendo a las especificaciones del fabricante. Se amplificó por PCR de manera independiente el fragmento de toxina de Cry1AbMod (región del DNA que codifica para el N terminal que abarca del aminoácido 59 al 617) con el oligo directo 5'-GAA CTT GGA **TCC ATG** GCA GGA CTA GTT GAT ATA ATA TGG GGA ATT TTT GGT CCC TCT (oligo A) que tienen el sitio sitio NcoI (resaltado en negrita) en el extremo 5' y el oligo reverso 5'- ATT CAC CGC CTT TTG TGC TCT TTC TAA ATC ATA TTC TGC CTC AAA GGT TAC (oligo B). Por un lado, se amplificó el fragmento de protoxina Cry1Ca1 (región C-terminal que abarca desde la región que codifica para el aminoácido 618 al 1189) usando como oligo directo 5'-GTA ACC TTT GAG GCA GAA TAT GAT TTA GAA AGA GCA CAA AAG GCG GTG AAT (oligo C) y como oligo reverso 5'-ACT GAC TGA **CCC GGG** GCT TAT TTT TAA GAG TAT GCT TTT ATT TTA GGA (oligo D) con sitio SmaI (resaltado en negrita) en el extremo 3'.

El mismo procedimiento y condiciones se llevaron a cabo para la toxina Cry1AcMod (región de DNA que codifica para el N terminal del aminoácido 59 al 617) con el oligo directo "A" con sitio NcoI en el extremo 5' y el oligo reverso 5'- GGC ATT CAC CGC CTT TTG TGC TCT TTC CAG ATT ATA TTC AGC CTC GAG TGT TGC (oligo B2). Por un lado el fragmento de protoxina Cry1Ca1 región C terminal usando como oligo directo 5'- GCA ACA CTC GAG GCT GAA TAT AAT CTG GAA AGA GCA CAA AAG GCG GTG AAT GCC (oligo C2) y como oligo reverso se utilizó el D con sitio SmaI en el extremo 3'.

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs) descritas, se llevaron a cabo bajo las condiciones siguientes: 95° C/2 min 1 ciclo, 95 ° C/15 s, 58° C/30s, 68° C/3 min, 30 ciclos, 68° C/3 min, 1 ciclo a 4° C hasta procesar en un termociclador modelo 2720 de Applied Biosystem.



En una segunda etapa de PCR se usaron simultáneamente como templado y mega-primers los productos de PCR generados en la etapa anterior, bajo las condiciones 95° C/5 min 1 ciclo, 95° C/1 min, 56° C/90s, 68° C/5 min 8 ciclos. Se adicionan 0.5 pmol de los oligonucleótidos externos A y D, 95° C/1 min, 56° C/90s, 68° C/5 min 22 ciclos, 68° C/10 min y 4°C hasta su procesamiento. Todos las PCRs se llevaron a cabo con la enzima de alta fidelidad Accu Prime de Invitrogen. El tamaño de los productos de PCR fueron evaluados en un gel de agarosa al 1.5%/TAE con el marcador de peso molecular *O'GeneRuler1kb DNA ladder de 250 a 10 mil pb de la marca Thermo Scientific*.

Un esquema de la estrategia para la construcción de las quimeras Cry1Ab(c)Mod/Cry1C se muestra en la figura 7.

Finalmente, el tamaño de las quimeras se corroboró por una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%/TAE y la banda se purificó y secuenció con los oligos A, B, C y D correspondientes (apéndice 1).

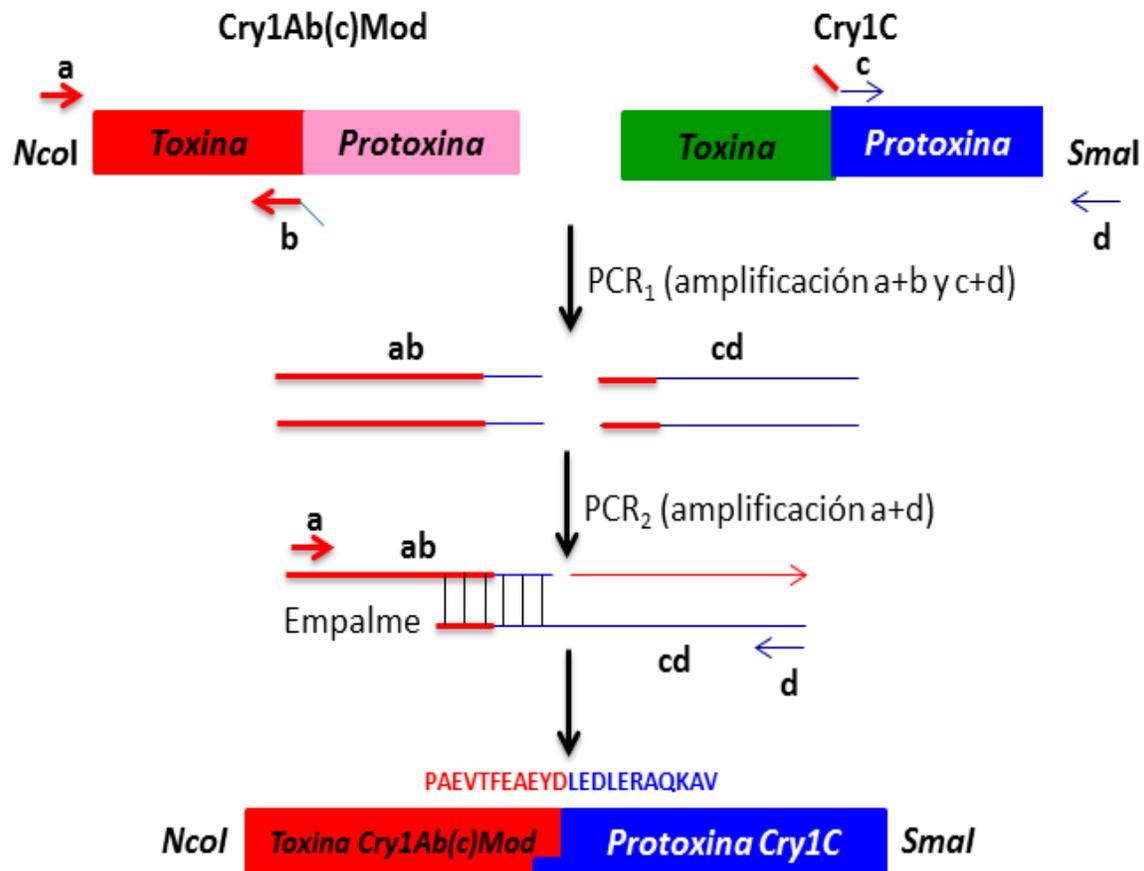
## **7.2 Amplificación de la toxina modificada Cry1CMod**

Se llevó a cabo la extracción y purificación del DNA plasmídico templado que contiene al gen que codifica para Cry1C silvestre, mediante el kit Wizard® Plus SV Minipreps de Promega atendiendo a las especificaciones del fabricante.

El gen que codifica para la toxina modificada de Cry1C se amplificó a partir de DNA plasmídico de *E. coli* que contenía al gen silvestre. La amplificación se llevó a cabo con los oligos 5'- CTT GGA TCC ATG GGA TTA ATA GAT TTT GTA TGG GG y 5'- ACT GAC TGA CCC GGG GCT TAT TTT TAA GAG TAT GC (véase anexo 1). La PCR se realizó con la enzima de alta fidelidad AccuPrime de Invitrogen y bajo las condiciones 95° C/5 min, 58° C/60s, 68° C/5 min 30 ciclos, 68° C/10 min y 4° C hasta su procesamiento. El tamaño de los



productos de PCR fueron evaluados con el marcador de peso molecular O'GeneRuler1kb DNA ladder de 250 a 10 mil pb de la marca Thermo Scientific.



**Figura 7.** Esquema de la estrategia experimental para la construcción de la quimera Cry1AbMod/Cry1C. Nótese la secuencia aminoacídica de transición entre la toxina Cry1bMod y la protoxina de Cry1C resaltada en la parte superior de la quimera y en los extremos de la misma, los sitios de restricción acoplados.



### **7.3 Clonación de la quimera Cry1AbMod/Cry1C y Cry1CMod en el vector pJET de *E. coli***

El producto de PCR correspondiente a la construcción de la quimera y la toxina modificada se purificaron cortando la banda correspondiente a dicho producto de PCR en un gel de agarosa con el kit MinElute® Gel Extraction Kit (250) de Qiagen atendiendo a las especificaciones del fabricante.

Posteriormente el amplicón se ligó al vector pJET en relación molar 1:3 con la enzima T4-Ligase de Thermo Scientific según las especificaciones del fabricante. Posteriormente se llevó a cabo la clonación en el CloneJET™ PCR Cloning Kit atendiendo a las especificaciones del fabricante. Células electrocompetentes de *E. coli* cepa MC1061 fueron transformadas con el producto de las ligaciones. Las cuales se prepararon a partir de un cultivo líquido en medio LB (10 g/L triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 5.8 mM de NaCl, pH 7.5) de una densidad óptica de 0.5-0.8<sub>600nm</sub> y se cosecharon por centrifugación a 5000rpm, 4° C/15 min en el rotor eppendorf F-34-6-38. Tras dos lavados con 50 mL de agua estéril fría, y un tercer lavado con 50 mL de glicerol al 10% estéril, las células se almacenaron a -70° C en alícuotas de 50 µL resuspendidas en glicerol al 10%.

Para transformar *E. coli* por electroporación, las células electrocompetentes recibieron un pulso de 2-5 segundos de 1.8 V/25 mA y las transformantes se analizaron en un medio de selección LB sólido con ampicilina a 100 µg/mL.

### **7.4 Caracterización de las quimera Cry1AbMod/Cry1C y Cry1CMod clonadas en pJET de *E. coli***

Para corroborar que las células habían incorporado el plásmido con el fragmento de DNA de interés, se realizaron dos pruebas previas a la secuenciación:

1. **PCR de colonias:** consiste en tomar una azada de células y resuspenderlas en 15 µL de agua desionizada, congelar las células a -70° C/1 h y hervirlas a 100°



C/5min para lisarlas. Centrifugar 10 min a 14500 rpm en el rotor eppendorf F 45-12-11 y recuperar el sobrenadante, para usarlo como templado para una reacción de PCR. Como oligonucleótidos se tomó el par de oligos que amplifican sólo la región de toxina en cada caso (véase anexo 1), bajo las condiciones 95° C/2 min 1 ciclo, 95° C/15s, 58° C/30s, 68° C/2min 30 ciclos, 68° C/10 min 1 ciclo, 4° C hasta su procesamiento. El tamaño de los productos de PCR fueron evaluados con el marcador de peso molecular *O'GeneRuler1kb DNA ladder de 250 a 10 mil pb de la marca Thermo Scientific*.

2. **Digestión:** Se extrajo DNA plasmídico de las transformantes con el kit Wizard® Plus SV Minipreps de Promega atendiendo a las especificaciones del fabricante y se digirió con las enzimas NcoI de NewEngland Biolabs 37° C/3 h y SmaI de NewEngland Biolabs 30° C/4 h. Los fragmentos de DNA se analizaron por tamaño en un gel de agarosa al 1.5%/TAE utilizando el marcador de peso molecular *O'GeneRuler1kb DNA ladder de 250 a 10 mil pb de la marca Thermo Scientific*.

La identidad de la construcción se corroboró por secuenciación.

### **7.5 Clonación de Cry1CMod y las quimeras Cry1AbMod/Cry1C y Cry1AcMod/Cry1C bajo el promotor de Cry3A en el vector pHT315**

Se digirió el DNA plasmídico de la purificación anterior con las enzimas de restricción NcoI y SmaI. La digestión se corrió en un gel de agarosa al 1.5% TAE, se cortó y purificó la banda correspondiente a la quimera. Tambipén se cortó el vector pHT315 que porta el promotor de Cry3A acoplado que fueconstruido por Salgado-Morales (2013) con las mismas enzimas [80]. La purificación se efectuó con el kit MinElute® Gel Extraction Kit (250) de Qiagen atendiendo a las especificaciones del fabricante.



Con las bandas purificadas del gel, se llevó a cabo la ligación de los genes en el vector pHT315 que contiene el promotor de Cry3A en relación molar vector-inserto 1:3, con T4 DNA Ligase de NewEnglands Biolabs atendiendo a las especificaciones del fabricante.

El producto de ligación se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* cepa MC1061, usando el protocolo mencionado anteriormente.

### **7.6 Caracterización de Cry1CMod y las quimeras p3A-Cry1Ab(c)Mod/Cry1C en *E. coli***

Para corroborar que el plásmido portaba el fragmento de DNA de interés, se realizó PCR d colonia, digestión con las enzimas NcoI y SmaI y posteriormente la secuenciación del DNA plasmídico en ambos sentidos con los oligonucleótidos A-R descritos en el anexo 1.

### **7.7 Clonación de Cry1CMod y las quimeras p3A-Cry1Ab(c)Mod en *Bt***

Cinco  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico de cada construcción se usaron para transformar células electrocompetentes de *Bt* cepa acristalífera 407. Las células cuales se prepararon a partir de un cultivo líquido en BHI (8 g/L de infusión de sólidos de cerebro y corazón, 5 g/L de digerido peptídico de tejido animal, 16 g/L de digerido pancreático de caseína, 5 g/L de NaCl, 2 g/L de glucosa, 2.5 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4) con agitación de 200 rpm hasta alcanzar una absorbancia de 0.5-0.8<sub>600nm</sub>. Las células se cosecharon por centrifugación a 5000rpm, 4° C/10 min en el rotor eppendorf F-34-6-38. Tras dos lavados con agua estéril fría, las células se resuspendieron en alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  de polietilenglicol al 40%.

Para transformar *Bt* por electroporación, las células electrocompetentes recibieron un pulso de 2.5 V/100 mA y las transformantes se seleccionaron por resistencia a antibiótico en medio sólido LB con eritromicina a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



## **7.8 Caracterización de la transformación en Bt de Cry1CMod y las quimeras p3A-Cry1Ab(c)Mod en Bt**

Para corroborar que las células habían incorporado el plásmido con el fragmento de DNA de interés, se realizaron las siguientes pruebas:

- 1. PCR de colonias:** A diferencia del PCR de colonias en *E. coli*, este método consiste en tomar una azada de células en estado vegetativo y resuspenderlas en 50  $\mu$ L de agua desionizada, congelar las células a  $-70^{\circ}$  C/1 toda la noche y hervirlas a  $100^{\circ}$  C/10min para lisarlas. Centrifugar 10 min a 14500 rpm en el rotor eppendorf F-45-12-11 y recuperar el sobrenadante, para usarlo como templado para una reacción de PCR, amplificando por separado una región de toxina y otra de protoxina C terminal en cada caso. Las condiciones fueron  $95^{\circ}$  C/1 min 1 ciclo,  $95^{\circ}$  C/15s,  $58^{\circ}$  C/30s,  $68^{\circ}$  C/60 s 30 ciclos,  $68^{\circ}$  C/10 min 1 ciclo,  $4^{\circ}$  C hasta su procesamiento. Los amplicones fueron analizados por tamaño en un gel de agarosa al 1%/TAE y los productos de PCR se purificaron a partir de un gel de agarosa. El tamaño de los productos de PCR fueron evaluados con el marcador de peso molecular *O'GeneRuler1kb DNA ladder de 250 a 10 mil pb de la marca Thermo Scientific*. La identidad de los mismos se corroboró por secuenciación.

## **7.9 Obtención y solubilización de espora-cristal de Cry1CMod y las quimeras p3A-Cry1Ab(c)Mod**

Se evaluaron cuatro clonas positivas de *Bt* obtenidas en la etapa anterior, y fueron puestas a esporular durante 72 horas a  $30^{\circ}$ C en medio sólido HCT (5 g/L de bactotripton, 2g/L de casaaminoácidos,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.026 M,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 mM,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1  $\mu$ M,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5  $\mu$ M,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.07 mM,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  5 mM, dextrosa 16



mM, agar 5%, suplementado con 10 µg/mL de eritromicina). La espora cristal fue lavada tres veces con PBS (150 mM NaCl, 2.8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O a pH 7.2) suplementado con 1 mM de EDTA y 1 mM PMSF. Los cristales se solubilizaron en un amortiguador suplementado con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 M, NaCl 0.1 M, EDTA 2 mM, β-mercaptoetanol 10 mM y PMSF 1 mM, pH 10.5 a 37°C por 1 h. Las protoxinas solubilizadas se centrifugaron 10 min a 14500 rpm para remover el material insoluble y se almacenaron a 4°C. Las fracciones solubles se analizaron en un gel de acrilamida al 10% bajo condiciones desnaturalizantes y se cuantificaron por el método de Bradford.

### **7.10 Bioensayos**

Los bioensayos se efectuaron en larvas del primer instar de *S. frugiperda* con base a lo reportado en [81]. El método consiste en suplementar diferentes concentraciones de toxina en la superficie de placas de 24 pozos como dieta a larvas de *S. frugiperda*. La mortalidad se evaluó al término de 7 días y la dosis efectiva se calculó usando análisis PROBIT (Polo-PC LeOra Software).



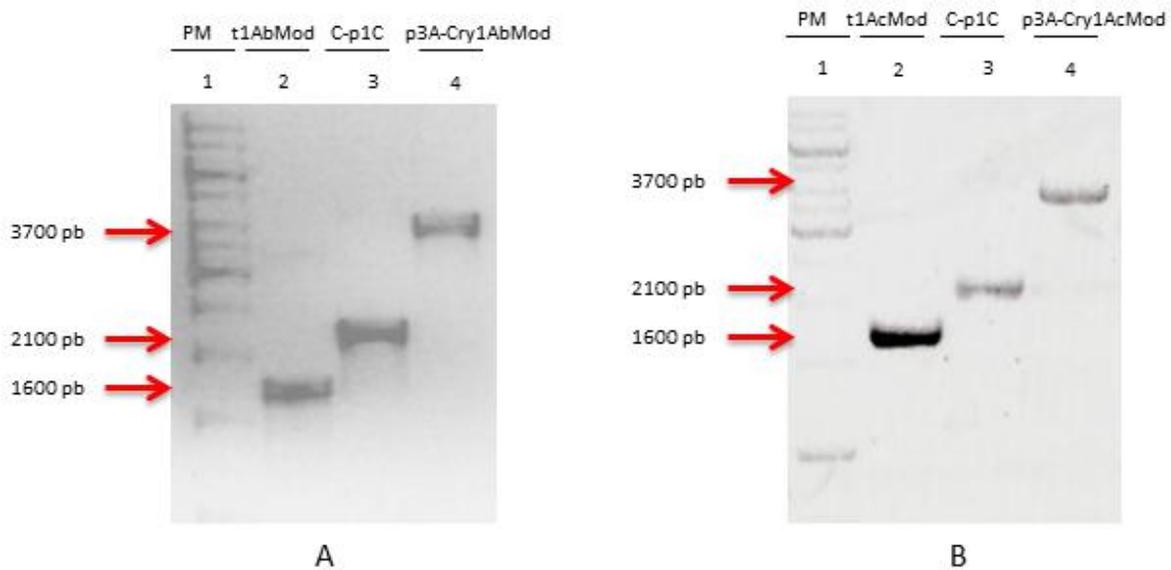
## **8.0 Resultados**

### **8.1 Construcción de los genes que codifican para las proteínas quimeras p3A-Cry1Ab(c)Mod y la proteína no quimera p3A-Cry1CMod**

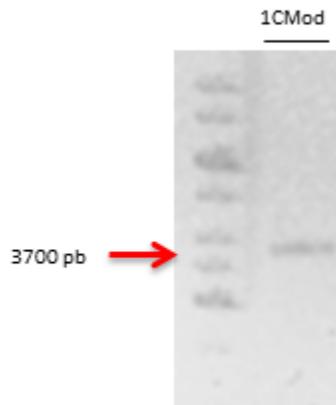
Con el fin de mejorar las propiedades de solubilidad de Cry1AbMod y Cry1AcMod, se decidió sustituir el fragmento C terminal de protoxina de éstas por el de Cry1C, mismo que Peng y colaboradores intercambiaron en la proteína Cry7Ba para mejorar la solubilidad y toxicidad.

Para construir los genes que codifican para las proteínas quimeras Cry1Ab(c)Mod/Cry1C, se realizó un empalme por PCR como se describe en la figura 6. En una primera PCR, se amplificó la región que corresponde a la toxina madura de Cry1Ab(c)Mod con el tamaño esperado de 1600 pb, así como al C terminal de protoxina de Cry1C con un tamaño de 2100 pb y ambos complementarios entre sí 60 pb. Se utilizó como templado el plásmido de *E. coli* que contenía al gen silvestre de Cry1Ab, Cry1Ac o Cry1C, según el caso. Posteriormente se realizó el empalme entre la región que codifica a la toxina madura Cry1AbMod y al C terminal de la protoxina Cry1C, y por otra parte, el empalme entre la toxina Cry1AcMod y el C terminal de la protoxina Cry1C, que a partir de ahora nombraremos como quimera Cry1AbMod/Cry1C y quimera Cry1AcMod/Cry1C, obteniendo un producto de PCR de 3700 pb aproximadamente que se muestra en la figura 8. La banda correspondiente se cortó, purificó y se corroboró su identidad por secuenciación tanto en la región de toxina madura de Cry1Ab(c)Mod, como de la región C terminal de la protoxina de Cry1C.

La construcción del gen que codifica para la proteína Cry1CMod, se amplificó de manera directa a partir del codón 59 hasta 100 pares de bases río abajo del codón de paro en el extremo 5'-UTR, partiendo de DNA plasmídico de *E. coli* que contenía al gen silvestre de Cry1C. El amplicón de interés de 3700 pb se muestra en la figura 9.



**Figura 8.** Gel de agarosa al 1.5% con los siguientes productos de PCR. A) Carril 2: Amplificación de la toxina *Cry1AbMod*, carril 3: Amplificación de la región C terminal de la protoxina *Cry1C*, carril 3: Empalme de la región de toxina madura *Cry1AbMod* y la región C terminal de la protoxina *Cry1C*, para formar la quimera *Cry1AbMod/Cry1C*. B) Carril 2: Amplificación de la región de toxina madura *Cry1AcMod*, carril 2: Amplificación de la región C terminal de la protoxina *Cry1C*, carril 3: Empalme de la región de la toxina madura *Cry1AcMod* y la región C terminal de la protoxina *Cry1C*, para formar la quimera *Cry1AcMod/Cry1C*. Tanto en la figura A y B se utilizó en el carril 1 el marcador de peso molecular descrito en materiales y métodos.



**Figura 9.** Gel de agarosa al 1.5% que muestra el producto de PCR correspondiente a *Cry1CMod* de 3700 pb.

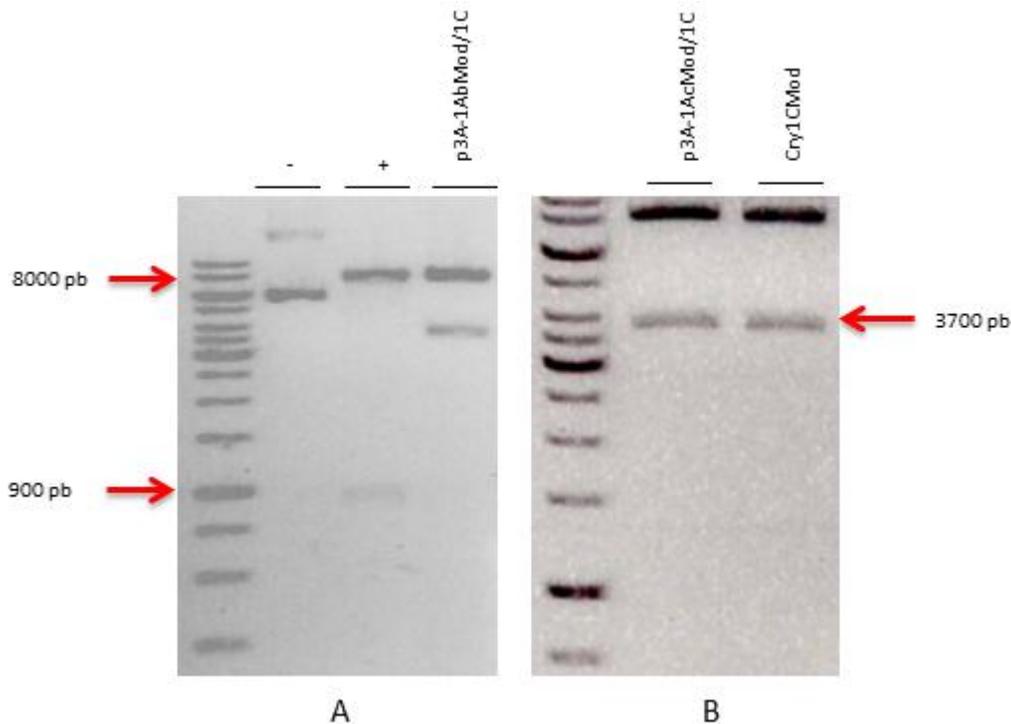
## 8.2 Clonación de los genes que codifican para las proteínas quimeras p3A-Cry1Ab(c)Mod y la proteína no quimera *Cry1CMod* en *E. coli*.

Con el fin de acoplar los genes que codifican para las quimeras *Cry1Ab(c)Mod/Cry1C* y para *Cry1CMod* al promotor de *Cry3A*, los productos de PCR se subclonaron inicialmente en el vector comercial pJET. Las clonas que portan el gen de interés fueron seleccionadas mediante PCR de colonias, y posteriormente se tomaron dos de ellas, para extraer DNA plasmídico el cual se digirió con las enzimas de restricción *NcoI* y *SmaI* (datos no mostrados).

Las bandas de los genes con el promotor de *Cry3A* se cortaron y purificaron a partir de gel de agarosa al 1.5% y se clonaron en el vector pHT315 previamente digerido con *NcoI* y *SmaI*. Tras seleccionar las clonas positivas mediante PCR de colonias y posterior digestión del DNA plasmídico con las enzimas mencionadas, se observó la liberación de un fragmento del tamaño esperado de aproximadamente 3700 pb y del vector de 8000 pb, como se muestra en la figura 10.



Las tres construcciones fueron secuenciadas en los dos sentidos en su totalidad. El análisis de las secuencias obtenidas fue realizado con el programa Applied Biosystems Sequence Scanner v1.0 Software y alineadas con el programa MegAling del paquete Lasergene de DNASTAR. No se encontró ningún cambio en la secuencia nucleotídica.



**Figura 10.** Gel de agarosa al 1.5% donde se muestra la digestión con *NcoI* y *SmaI* del fragmento de las quimeras *p3A-Cry1AbMod/Cry1C* y *p3A-Cry1AcMod/Cry1C*, así como de la toxina *Cry1CMod* clonadas en el vector *pHT315* con el promotor de *Cry3A*. A) Carril 1: Control negativo, vector *pHT315* con el promotor de *Cry3A* sin digerir. Carril 2: Control positivo, vector *pHT315* con el promotor de *Cry3A* digerido con *NcoI* y *SmaI*. Nótese la liberación de un fragmento de 900 pb correspondiente al gen de resistencia a kanamicina. Carril 3: Plásmido de la clona de la quimera *p3A-Cry1AbMod/Cry1C*, digerido con *NcoI* y *SmaI*. B) Carril 1: Plásmido de la clona de la quimera *p3A-Cry1AcMod/Cry1C*, digerido con *NcoI* y *SmaI*. Carril 2: Plásmido de la clona *Cry1CMod*, digerido con *NcoI* y *SmaI*. En estos

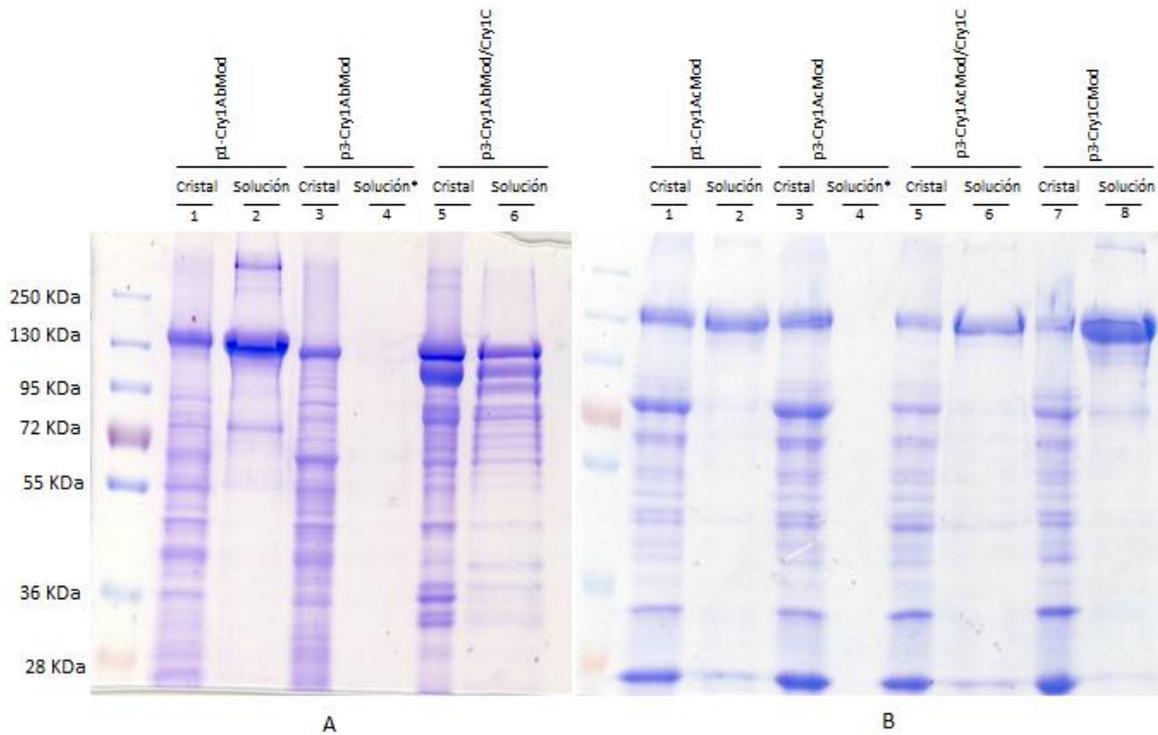


*últimos tres, nótese la liberación del fragmento del tamaño esperado de 3700 pb aproximadamente y del vector cortado de 8000 pb.*

### **8.3 Expresión y solubilización de Cry1CMod y de las quimeras p3A-Cry1AbMod/Cry1C y p3A-Cry1AcMod/Cry1 C en *Bt***

Las quimeras p3A-Cry1AbMod/Cry1C y p3A-Cry1AcMod/Cry1C, así como la construcción Cry1CMod fueron clonadas en *B. thuringiensis*, cepa acristalífera 407. De las transformantes obtenidas se seleccionó una de ellas en la que mediante PCR en colonia, fue posible amplificar de manera específica y por separado tanto la región de toxina como la región C terminal de la protoxina (figura no mostrada). La identidad de los productos de PCR fueron corroborados por secuenciación.

Posteriormente, se purificó espora-cristal de las tres construcciones. Los resultados muestran que las dos quimeras recobraron la solubilidad a pH 10.5 que perdían al expresarse bajo el promotor de Cry3A, nótese la banda de interés de 130 kDa en la figura 11, correspondiente a la fracción soluble. Por su parte, la construcción correspondiente a Cry1CMod, denotó ser soluble bajo este mismo promotor, sin necesidad de ninguna modificación adicional. (Consultar el por ciento de solubilidad en la tabla 5.



**Figura 11.** Gel desnaturalizante de acrilamida al 10% donde se analizaron espora cristal y fracción soluble de la misma en amortiguador de carbonatos a pH 10.5. A: Carril 1: Espora cristal de p1-Cry1AbMod; carril 2: Fracción soluble de p1-Cry1AbMod; carril 3: Espora cristal de p3A-Cry1AbMod; carril 4: Fracción soluble de p3A-Cry1AbMod; carril 5: Espora cristal de la quimera p3A-Cry1AbMod/Cry1C; carril 6: Fracción soluble de la quimera p3A-Cry1AbMod/Cry1C. B: Carril 1: Espora cristal de p1-Cry1AcMod; carril 2: Fracción soluble de p1-Cry1AcMod; carril 3: Espora cristal de p3A-Cry1AcMod; carril 4: Fracción soluble de p3A-Cry1AcMod; carril 5: Espora cristal de la quimera p3A-Cry1AcMod/Cr1C; carril 6: Fracción soluble de la quimera p3A-Cry1AcMod/Cry1C; carril 7: Espora cristal de Cry1CMod; carril 8: Fracción soluble de Cry1CMod. \*Nótese que con un asterisco se indica a las esporas-cristales que no fueron solubilizados.



Cabe resaltar que al observar al microscopio la espora cristal de las tres construcciones, Cry1CMod fue la única que exhibió la clásica forma bipiramidal de la familia de las Cry1s [82], mientras que ambas quimeras, por su parte, formaban inclusiones cristalinas irregulares y pequeñas (datos no mostrados). El resumen de resultados puede consultarse en la tabla 5.

#### 8.4 Análisis de la toxicidad de Cry1CMod y de las quimeras p3A-Cry1AbMod/Cry1C y p3A-Cry1AcMod/Cry1C

La toxicidad de la quimera p3A-Cry1AbMod/Cry1C fue evaluada por triplicado en larvas de *S. frugiperda*. Las dosis letales 50 (LD<sub>50</sub>) obtenidas se muestran en las tabla 4.

**Tabla 4.** Toxicidad de espora cristal solubilizada de Cry1CMod y de las quimeras p3A-Cry1AbMod/Cry1C hacia larvas de *S. frugiperda*.

Proteína	Toxicidad hacia <i>S. frugiperda</i>	Límites de confiabilidad (0.90)	Valor del cuadrado de Chi	Grados de libertad
p1-Cry1AbMod	LD <sub>50</sub> (ng*mL <sup>-1</sup> )	(1637.147±1962.738)	8.85	8
p3A-Cry1AbMod	No tóxica	No determinado	No determinado	No determinado
p3A-Cry1AbMod/Cry1C	LD <sub>50</sub> (ng*mL <sup>-1</sup> )	(1302.014±1869.394)	10.36	8

LD<sub>50</sub>. Dosis letal a la que el 50% de la población ha muerto. Todas las LD<sub>50</sub> reportadas fueron el promedio de tres réplicas biológicas.



## 8.5 Resumen de resultados

**Tabla 5.** Resumen de resultados.

Proteína	%Solubilidad (pH 10.5)	Forma de los cristales	Toxicidad hacia <i>S. frugiperda</i>  LD <sub>50</sub> (ng*mL <sup>-1</sup> )
p1-Cry1Ab-wt	98.5±0.05	Bipiramidales	No tóxica
p1-Cry1Ac-wt	96.5±0.05	Bipiramidales	No determinado
p1-Cry1AbMod	97.7±0.05	Bipiramidales	1804.25 (1637.15-1962.74)
p1-Cry1AcMod	95.9±0.03	Bipiramidales	326.5 (271.4-383.8)
p3A-Cry1AbMod	Insoluble	Bipiramidales	No tóxica
p3A-Cry1AcMod	Insoluble	Bipiramidales	No tóxica
p3A-Cry1AbMod/Cry1C	99.4±0.05	Pequeñas inclusiones cristalinas irregulares	1606.18 (1302.01-1869.39)
p3A-Cry1AcMod/Cry1C	50.6±0.04	Pequeñas inclusiones cristalinas irregulares	862.7 (397.1-1261.1)
p3A-Cry1CMod	70.1±0.04	Bipiramidales	370.1 (260.4-462.5)

*LD<sub>50</sub>: Dosis letal a la que el 50% de la población ha muerto. Todos los valores numéricos reportados fueron el promedio de tres réplicas biológicas. El error reportado en la cuantificación de la solubilidad corresponde a la desviación estándar, mientras que el error reportado para las LD<sub>50</sub>, corresponden a los límites de confiabilidad superior e inferior de la función PROBIT.*



## **9.0 Discusión**

Como se mencionó anteriormente, las protoxinas Cry de Bt con un tamaño de 130 kDa, son activadas proteolíticamente en el intestino de la larva, liberándose un fragmento tóxico de 60 kDa. Mientras que esta región tóxica de 60 kDa ha sido ampliamente estudiada, poco se conoce sobre la función biológica de la región C terminal de protoxina. Un alineamiento entre 42 secuencias de proteínas Cry realizado por Bravo y colaboradores (1997) reveló que la región de protoxina C terminal, se encuentra altamente conservada.

Aunado a ello, mientras que la región de toxina madura posee un carácter preponderantemente hidrofóbico, la región C terminal de protoxina es hidrofílica y, para el caso de las proteínas Cry1A, posee 14 de las 16 cisteínas totales. Las otras dos cisteínas se encuentran en la región N terminal de la protoxina, la cual fue escindida de las construcciones modificadas por Soberón y colaboradores (2007).

Los resultados obtenidos por Peng y colaboradores, demuestran que la construcción de una proteína quimera con Cry7Ba a la que se le ha sustituido el fragmento C terminal de protoxina por el de Cry1C, no sólo incrementa su solubilidad sino además le confiere toxicidad [79]. Un alineamiento realizado entre las toxinas Cry7Ba y Cry1C, denotó que ambas toxinas compartían un 54% de identidad y además que las cisteínas de la región C terminal de protoxina entre ambas se encuentran poco conservadas (véanse resaltadas en amarillo en el alineamiento mostrado en la figura 12). Aunado a ello cabe resaltar que las cisteínas mutagenizadas puntualmente (C729S y C654S en p3A-Cry1AbMod y C730S en p3A-Cry1AcMod) por García-Gómez y colaboradores (2013), (resaltadas con flechas verdes en la figura 13) que produjeron mutantes con fenotipo soluble, interesantemente se encuentran conservada en Cry1C.

Con base en ello, se siguió la misma estrategia pero en el contexto de las toxinas modificadas por Soberón y colaboradores [70]. Para el diseño y construcción de las dos quimeras, elegimos dos tipos de secuencias. Por una parte Cry1Ab que comparada con



Cry1C, carece de 4 cisteínas en la región C terminal de protoxina por otro lado Cry1Ac cuyas cisteínas se encuentran, con excepción de una, todas conservadas respecto a Cry1C (figura 13).

Interesantemente nuestros resultados demuestran que la sustitución de la región C terminal de la protoxina de Cry1Ab(c)Mod por el de Cry1C, es capaz de devolver tanto la solubilidad como la toxicidad a pH 10.5 que Cry1Ab(c)Mod perdían al expresarse bajo el promotor de Cry3A. En el caso de la quimera p3A-Cry1AbMod/Cry1C, ésta no exhibe una diferencia en toxicidad estadísticamente significativa respecto a Cry1AbMod, expresada bajo su promotor nativo. No obstante es de considerar por el patrón observado en los carriles 5 y 6 de la figura 11, que esta construcción posiblemente sea inestable y que las bandas de menor peso molecular que 130 kDa que se observan y que además fueron detectadas mediante Western blot con el anticuerpo antiCry1Ab (figura no mostrada), correspondan a proteína degradada. Por lo que presumiblemente la cuantificación de proteína quimera íntegra adicionada en los bioensayos esté sobreestimada. Por otra parte, en el caso de la quimera p3A-Cry1AcMod, perdió aproximadamente 2.6 veces la toxicidad respecto a Cry1Ac expresada bajo su promotor nativo. De las tres construcciones realizadas en el presente trabajo, la mutante Cry1CMod exhibió la mayor toxicidad con una LD<sub>50</sub> correspondiente a 370.1 (260.4-462.5) ng/mL (véase tabla 5).

Es interesante que nuestras construcciones quiméricas exhiban diferentes toxicidades respecto a Cry1AbMod y Cry1AcMod expresadas bajo su promotor nativo, pues contrasta con lo reportado previamente por Raymond y colaboradores (1990) quienes mediante quimeras demostraron que es el fragmento de toxina activado proteolíticamente, por sí mismo, es el que determina tanto la actividad como la especificidad insecticida y no el fragmento C terminal de protoxina. Por otra parte, nuestros resultados apoyan la reciente propuesta de Gómez y colaboradores, quienes demuestran la formación de dos diferentes pre-poros funcionales, lo cuales se forman después de la unión a caderina, bien como protoxina o como toxina activada por proteasas, previa a la inserción a la membrana. En este artículo los autores proponen que no sólo los diferentes insectos poseen diferentes



receptores, sino también diferentes proteasas intestinales que pueden influir en la velocidad de la activación de las toxinas o protoxinas [83]. En este mismo artículo se demuestra que Cry1AbMod como protoxina es capaz de oligomerizar, pero no así como toxina activada, lo cual explica la pérdida de potencia de ésta ante insectos susceptibles [83]. Con base en lo anterior, podemos proponer que la diferencia en toxicidad se deba a que las proteínas quimeras construidas en el presente trabajo, posiblemente formen un pre-poro distinto, al que forman como Cry1AbMod o Cry1AcMod con su fragmento de protoxina C terminal nativo. O bien que éstas quimeras (como protoxinas) interaccionen de distinta manera con los receptores del intestino del insecto, como previamente se ha reportado que sucede con Cry1Ac y caderina [84].

Vale la pena destacar también que la sustitución del fragmento C terminal de protoxina de Cry1AbMod y Cry1AcMod por el de Cry1C, afecta asimismo la capacidad de cristalización bipiramidal típica, pues en lugar de exhibir los clásicos cristales bipiramidales de la familia de Cry1s, ambas quimeras forman inclusiones cristalinas irregulares y pequeñas. Estos resultados son congruentes con lo reportado en [79], quienes comprueban que sus quimeras son incapaces de cristalizar. Asimismo cabe resaltar que si bien la quimera p3A-Cry1AcMod/Cry1C fue estable bajo nuestras condiciones de trabajo, la quimera p3A-Cry1AbMod/Cry1C, presumiblemente sea más inestable.

Asimismo, nuestros resultados son congruentes con lo reportado por Soon Kim y colaboradores (1998), quienes construyeron dos proteínas quimeras mediante el intercambio de la región codificante del fragmento C terminal de protoxina de Cry1Ab proveniente de la cepa de *B. thuringiensis* AF101, por un lado, y por otro por el C terminal de Cry1Ab proveniente de *B. thuringiensis* serotipo kurstaki (HD-1). La quimera AF101, exhibió una toxicidad similar que la parental hacia larvas de *B. mori*, mientras que la quimera HD-1 resultó menos tóxica con respecto a su parental y atribuyen esta diferencia a 4 cisteínas en las que difieren ambas regiones C terminal de protoxina que podría estar relacionada con cierta inestabilidad estructural, aunque los autores no lo comprueban [85]. Con base en ello, podríamos sugerir por analogía que posiblemente la pérdida de



toxicidad de la quimera p3A-Cry1AcMod/Cry1C con respecto a p1-Cry1AcMod, se atribuya a cierta inestabilidad estructural, dada la conformación irregular del cristal de ésta.

En el presente trabajo se construyó también la proteína no quimérica p3A-Cry1CMod, que fungió asimismo como un control interno en la caracterización de las quimeras, pues ésta posee su región nativa C terminal de protoxina. Como era de esperarse, esta proteína, al expresarse bajo el promotor de Cry3A, fue soluble y sus cristales conservaron la forma clásica bipiramidal.

Se ha propuesto que los grupos tiol del cristal proteico solubilizado a pH alcalino y condiciones reductoras, se exponen en la superficie de la molécula y los puentes disulfuro intercatenarios estabilizan la estructura cristalina [78]. Nuestros resultados arrojan que el hecho de que las dos quimeras construidas, hayan recobrado tanto su solubilidad como la toxicidad que perdían al expresarse bajo el promotor de Cry3A, podría sugerir que este fragmento C terminal de protoxina de Cry1C le provee cierta conformación estructural que le permite solubilizarse bajo las condiciones de interés. Se sugiere que podría ser de utilidad realizar estudios posteriores para determinar si este cambio se atribuye a un arreglo particular de los puentes disulfuro y si esta propiedad también se logra con fragmentos C terminal de protoxina de otras proteínas Cry.



```

Cry7Ba      LEKAQKAVNALFTAG-RNALQTDVTDYKVDQVSIIVDCVSGELYPNKRELLSLVKYAKR 59
Cry1C      LERAQKAVNALFTSSNQIGLKTIDVTDYHIDQVSNLVDCLSDDEFCLDEKRELSEKVKHAKR 60
**:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Cry7Ba      LSYSRNLLLDPTFDSINSSDENGWYGSNGIAIGNGNFVFKGNLYLIFSGTNDTIQYPTYLYQ 119
Cry1C      LSDERNLLQDPNFRGINRQPDRGWRGSTDITIQGGDDVFKENYVTLPGTVDECYPTYLYQ 120
**.*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Cry7Ba      KIDESKLEKEYTRYKLRGFIENSQDLEAYVIRYDAKHETLDVSNN---LLPDISFVNACG 175
Cry1C      KIDESKLEKAYTRYELRGYIEDSQDLEIYLIRYNAKHEIVNVPGTGLWPLSAQSPIGKCG 180
***** **:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Cry7Ba      EPNRCAALQYLDENPRLECSSIQDG-ILSDSHSFSLSNIDTGSIDFNENVGIWVLFKISTP 234
Cry1C      EPNRCAP--HLEWNPDLDCSCRDEKCAHSHHFTLDIDVGCTDLNEDLGWVWVFKIKTQ 238
***** .:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*.*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Cry7Ba      EGYAKFGNLEVIEDSFVIGEALARVKRQETKWRNKLTQLRTETQAIYTRAKQAIDNVFTN 294
Cry1C      DGHARLGNLEFLEEKPLLGEALARVKRAEKKWRDKREKLQLETNIVYKEAKESVDALFVN 298
:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Cry7Ba      AQDShLKIGITFAAIVAARKIVQSIREAYMSWLSIVPGVNYPIFTELNERVQRAFQLYDV 354
Cry1C      SQYDRLQVDTNIAMIHAADKRVHRIREAYLPELSVIPGVNAAI FEELEGRI FTAYSLYDA 358
:* ..:*:*:*:*:* * * * * *:*:*:*:*:* ..:*:*:* ..* *:* *:*:*:*

Cry7Ba      RNVVRNGRFLNGVSDWIVTSDVKVQEENG-NVLVLSNWDQVLQCLKLYQDRGYILRVT 413
Cry1C      RNVIKNGDFNNGLLCWNVKGHVDEEQNNHRSVLVIPEWEAEVSVQEVVRCVPGRGYILRVT 418
***:*:* * *:* * *..*:*:*:*:* ..*:*:*:*:* * *:* ..*

Cry7Ba      ARKEGLGEGYITITDEEGHTDQLTFGTCEEIDASN----- 448
Cry1C      AYKEGYGEGCVTIHEIEDNTDELKFSNCVEEEVYPNNTVTCNNYTGTEEEYEGTYTSRNQ 478
* * * * * *:* * *:* *:*:*:*:*:* * *

Cry7Ba      -----TFVTTGYITKELEFFPD 465
Cry1C      GYDEAYGNNPSPADYASVYEEKSYTDGRRENPCESNRGYGDYIPLPAGYVIKDLEYFPE 538
* ..:*:*:*:*:*:*:*

Cry7Ba      TEKVRIEIGETEGTFQVESIELFILMEDLC 494
Cry1C      TDKVWIEIGETEGTFIVDSVELLMEE-- 565
*:* * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

**Figura 12.** Alineamiento entre la protoxina C terminal de Cry7Ba (secuencia superior) y la protoxina C terminal de Cry1C (secuencia inferior). Con flecha roja se ha resaltado la cisteína C854 mutagenizada puntualmente en Cry7Ba que le confirió solubilidad.

Análisis de la participación del fragmento de protoxina C terminal de Cry1Ab(c)Mod en su solubilidad y toxicidad



```

Cry1Ab  LERAQKAVNELFTSSNQIGLKTVDVTDYHIDQVSN → CLSDEPCLDEKGLSEKVKHAKR 60
Cry1C   LERAQKAVNALFTSSNQIGLKTVDVTDYHIDQVSNLVDCLSDEPCLDEKGLSEKVKHAKR 60
Cry1Ac  LERAQKAVNALFTSTNQGLKTNVDYHIDQVSNLVTLSDEPCLDEKRELSEKVKHAKR 60
*****  *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Cry1Ab  LSDERNLLQDPNFRGINRQDRGWRGSTDITIQGGDDVFKENYVTLVLT → CYPTYLQ 120
Cry1C   LSDERNLLQDPNFRGINRQDRGWRGSTDITIQGGDDVFKENYVTLVLT → CYPTYLQ 120
Cry1Ac  LSDERNLLQDSEPKDINRQPERGWGGSTGITIQGGDDVFKENYVTLVLT → CYPTYLQ 120
*****  **:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Cry1Ab  KIDESKFKAYTRYQLRQGYIEDSQDLEIYLIRYNAPCHETVNVVPGTGLWPLSAPSPIG--- 177
Cry1C   KIDESKFKAYTRYELRQGYIEDSQDLEIYLIRYNAPCHETVNVVPGTGLWPLSAQSPIGKCG 180
Cry1Ac  KIDESKFKAFTRYQLRQGYIEDSQDLEIYLIRYNAPCHETVNVVPGTGLWPLSAQSPIGKCG 180
*****  *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Cry1Ab  -----KCAHNSHHFSLDIDVGCCTDLNEDLGVWVIFKIKTQDG 214
Cry1C   EPNRCAPHLEWNPDLDCSCRDGEKCAHNSHHFTLDIDVGCCTDLNEDLGVWVIFKIKTQDG 240
Cry1Ac  EPNRCAPHLEWNPDLDCSCRDGEKCAHNSHHFSLDIDVGCCTDLNEDLGVWVIFKIKTQDG 240
*****  *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Cry1Ab  HARLGNLEFLEEKPLVGEALARVWRAEKGGRDREKLEWETNIVYKEAKEVSDALFVNSQ 274
Cry1C   HARLGNLEFLEEKPLLGEALARVWRAEKGGRDREKLEWETNIVYKEAKEVSDALFVNSQ 300
Cry1Ac  HARLGNLEFLEEKPLVGEALARVWRAEKGGRDREKLEWETNIVYKEAKEVSDALFVNSQ 300
*****  *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Cry1Ab  YDRLQADTNIAMIHAADEKRVHSIREAYLPELSVIPGVMAAIFEELEGRIFTAFSLYDARN 334
Cry1C   YDRLQVDTNIAMIHAADEKRVHIREAYLPELSVIPGVMAAIFEELEGRIFTAYSLYDARN 360
Cry1Ac  YDQLQADTNIAMIHAADEKRVHSIREAYLPELSVIPGVMAAIFEELEGRIFTAFSLYDARN 360
*****  **:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Cry1Ab  VIKNGDFNNGLSQWVWGHVTVVEEQNNHRSVLVWPEWAEVVSQEVKWCPRGYILRVITAY 394
Cry1C   VIKNGDFNNGLLCQWVWGHVTVVEEQNNHRSVLVWPEWAEVVSQEVKWCPRGYILRVITAY 420
Cry1Ac  VIKNGDFNNGLSQWVWGHVTVVEEQNNHRSVLVWPEWAEVVSQEVKWCPRGYILRVITAY 420
*****  *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Cry1Ab  KEGYGEGCVTIHEIENNTDELKFPSCVVEEVYPSNTVTQNDYTATQEEYEGTYTSRNRGY 454
Cry1C   KEGYGEGCVTIHEIEDNTDELKFPSCVVEEVYPSNTVTQNYTGTQEEYEGTYTSRNRQGY 480
Cry1Ac  KEGYGEGCVTIHEIENNTDELKFPSCVVEEIIYPSNTVTQNDYTVNQEEYGGAYTSRNRGY 480
*****  *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Cry1Ab  DGAYESNSVFPADYASAYEESKAYTDGRRDNPCESNRGYGDYTFPLPAGYVTKLELYFPETD 514
Cry1C   DEAYGNPSVFPADYASVYEEKSYTDGRRDNPCESNRGYGDYTFPLPAGYVTKDLELYFPETD 540
Cry1Ac  NEA----PSVFPADYASVYEEKSYTDGRRDNPCEPNRGYRDYTFPLPAGYVTKLELYFPETD 536
*****  : * _*****_*****:*****:***** *****_*****:*****

Cry1Ab  KWNIEIGETEGTFIVDSVELLIMEE 539
Cry1C   KWNIEIGETEGTFIVDSVELLIMEE 565
Cry1Ac  KWNIEIGETEGTFIVDSVELLIMEE 561
*****

```

**Figura 13.** Alineamiento entre la región de protoxina C terminal de Cry1Ab (secuencia superior), Cry1C (secuencia media) y Cry1Ac (secuencia inferior). Con flechas rojas se señalan las cisteínas C654 y C729 mutagenizadas puntualmente en p3A-Cry1AbMod y C730S en p3A-Cry1AcMod, mutación tal que le confirió solubilidad cuando las respectivas toxinas se expresaban bajo el promotor de Cry3A.



## **10.0 Conclusiones**

- a) Se logró la construcción de las toxinas quimeras mediante la técnica de empalmes, con buen rendimiento de la reacción de PCR y sin productos inespecíficos, lo cual reduce en gran medida el trabajo, costo y tiempo para la realización de este tipo de construcciones.
- b) Se demostró que modificando el fragmento de C terminal de las protoxinas, Cry1Ab(c)Mod por el de Cry1C, las quimeras obtenidas son capaces de recuperar la solubilidad y toxicidad que perdían cuando se expresaban bajo el promotor de Cry3A en su forma no quimérica.
- c) La sustitución del fragmento C terminal de protoxina de Cry1Ab(c)Mod, afecta la capacidad de cristalización bipiramidal.
- d) Se logró asimismo la construcción de Cry1CMod, la cual fue soluble a pH 10.5, exhibió cristales bipiramidales y fue tóxica hacia *S. frugiperda*.
- e) Nuestros resultados abren la puerta a futuros trabajos enfocados en la generación de nuevas toxinas Cry modificadas que al estar expresadas bajo el promotor de Cry3A, no generen rearreglos en *E. coli*, que sean solubles a pH 10.5 propio del intestino de la larva y, potencialmente, con mejoradas propiedades insecticidas.



## 11.0 Anexos

### 11.1 Anexo 1: Oligonucleótidos utilizados

**Anexo 1.** Descripción de los oligonucleótidos utilizados en la construcción y secuenciación de las quimeras p3A-Cry1Ab(c)Mod/Cry1C.

<b>Oligo</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Zona de hibridación</b>	<b>Sentido</b>
A	5'-CTT GGA TCC ATG GCA GGA CTA GTT GAT ATA ATA TGG	Inicio de la toxina Cry1Ab(c)Mod	Directo
B	5'-ATT CAC CGC CTT TTG TGC TCT TTC TAA ATC ATA TTC TGC CTC AAA GGT TAC	Final de la toxina Cry1AbMod	Reverso
B2	5'- GGC ATT CAC CGC CTT TTG TGC TCT TTC CAG ATT ATA TTC AGC CTC GAG TGT TGC	Final de la toxina Cry1AcMod	Reverso
C	5'-GTA ACC TTT GAG GCA GAA TAT GAT TTA GAA AGA GCA CAA AAG GCG GTG AAT	Inicio de la protoxina (región C-terminal) de Cry1C con residuo de Cry1Ab	Directo
C2	5'- GCA ACA CTC GAG GCT GAA TAT AAT CTG GAA AGA GCA CAA AAG GCG GTG AAT GCC	Inicio de la protoxina (región C-terminal) de Cry1C con residuo de Cry1Ac	Directo



D	5'-ACT GAC TGA CCC GGG GCT TAT TTT TAA GAG TAT GC	Región 3'-UTR, 100 pb aprox. río abajo del codón de paro donde finaliza la protoxina de Cry1C	Reverso
F	5'-TAG GAT CTG CTT CCC ACT CTC TAA A	Región interna de la toxina de Cry1Ab	Reverso
G	5'-TGT AGA AGA GCA AAA CAA CCA CCG TTC	Región interna de la protoxina de Cry1C	Directo
H	5'-GAA CGG TGG TTG TTT TGC TCT TCT ACA	Región interna de la protoxina de Cry1C	Reverso
I	5'-TGT AAG CGA TCG GAT AAC TCT GTG TAA	Región interna de la protoxina de Cry1C	Reverso
J	5'- CCC TAC AGG AGA AGC CAT TAT TTG ATG CCC	Región interna de la toxina de Cry1Ab(c)	Reverso
K	5'- CAG GGC GTG TAT AGA ACA TTA TCG TCC	Región interna de la toxina de Cry1Ab(c)	Directo
L	5'- GGA CTG TAG GTT TTA CTA CTC CG	Región interna de la toxina de Cry1Ab	Directo
M	5'- TGG ATA GCA CTC ATC AAC GGT ACC	Región interna de la protoxina de Cry1C	Reverso
N	5'- CCA GAG TTG TCT GTG ATT CC	Región interna de la protoxina de Cry1C	Directo
O	5'- GGA ATC ACA GAC AAC TCT GG	Región interna de la	Reverso

*Análisis de la participación del fragmento de protoxina C terminal de  
Cry1Ab(c)Mod en su solubilidad y toxicidad*

---



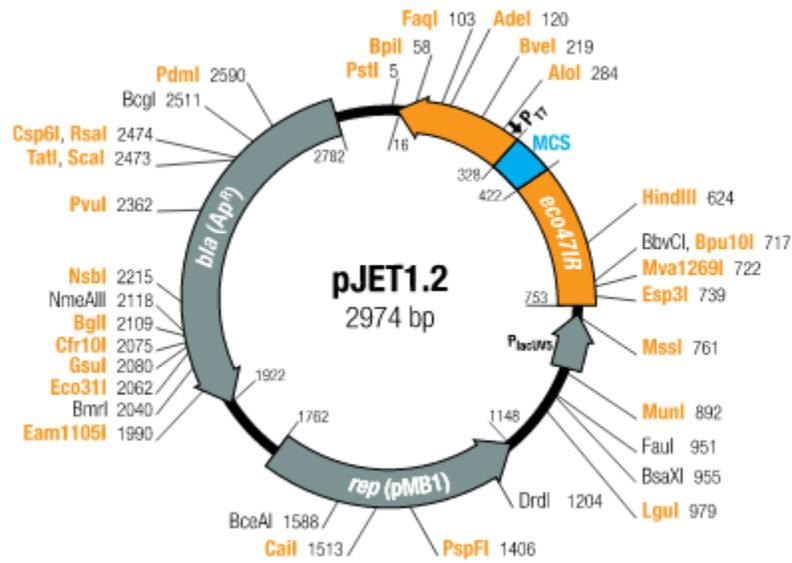
		protoxina de Cry1C	
P	5'- CCG GCT GGT TAT GTA ACA AAG G	Región interna de la protoxina de Cry1C	Directo
Q	5'- CCT TTG TTA CAT AAC CAG CCG G	Región interna de la protoxina de Cry1C	Reverso
R	5'- CTT GGA TCC ATG GGA TTA ATA GAT TTT GTA TGG GG	Inicio de la toxina Cry1CMod	Directo

---



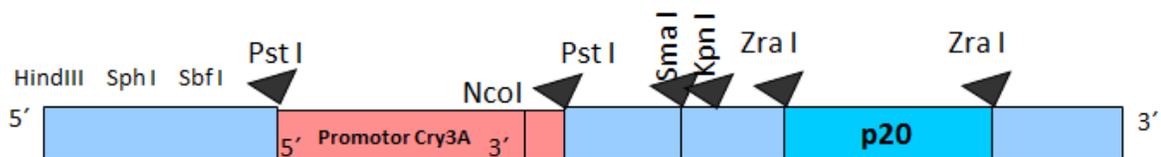
## 11.2 Anexo 2: Plásmidos utilizados

Para la sub-clonación de las construcciones se utilizó el vector comercial pJET de Thermo Scientific mostrado en la figura 14.



**Figura 14.** Mapa del vector comercial pJET de Thermo Scientific.

El vector de expresión empleado para las clonaciones en *E. coli* fue una versión modificada del plásmido pHT315 de New England Biolab, la cual se esquematiza en la figura 15.



**Figura 15.** Esquema del vector de expresión pHT315 de New England Biolab modificado por [80].



## 11.0 Referencias

1. FAO, [http://www.fao.org/index\\_en.htm](http://www.fao.org/index_en.htm). Food and Agriculture Organization of the United Nations.
2. Weichenthal, S., C. Moise, and P. Chan, *A review of pesticide exposure and cancer incidence in the agricultural health study cohort*. *Cien Saude Colet*, 2012. **17**(1): p. 255-70.
3. Freire, C. and S. Koifman, *Pesticides, depression and suicide: a systematic review of the epidemiological evidence*. *Int J Hyg Environ Health*, 2013. **216**(4): p. 445-60.
4. Martenies, S.E. and M.J. Perry, *Environmental and occupational pesticide exposure and human sperm parameters: a systematic review*. *Toxicology*, 2013. **307**: p. 66-73.
5. Bravo, A., et al., *Bacillus thuringiensis: A story of a successful bioinsecticide*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2011. **41**(7): p. 423-31.
6. Buzoianu, S.G., et al., *Effects of feeding Bt maize to sows during gestation and lactation on maternal and offspring immunity and fate of transgenic material*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e47851.
7. Tian, J.C., et al., *Transgenic Cry1Ab rice does not impact ecological fitness and predation of a generalist spider*. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e35164.
8. Bravo, A., et al., *Evolution of Bacillus thuringiensis Cry toxins insecticidal activity*. *Microb Biotechnol*, 2013. **6**(1): p. 17-26.
9. Schnepf, E., et al., *Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998. **62**(3): p. 775-806.
10. Sansinenea, E., C. Vazquez, and A. Ortiz, *Genetic manipulation in Bacillus thuringiensis for strain improvement*. *Biotechnol Lett*, 2010. **32**(11): p. 1549-57.
11. Raymond, B., et al., *Bacillus thuringiensis: an impotent pathogen?* *Trends Microbiol*, 2010. **18**(5): p. 189-94.
12. de Maagd, R.A., A. Bravo, and N. Crickmore, *How Bacillus thuringiensis has evolved specific toxins to colonize the insect world*. *Trends Genet*, 2001. **17**(4): p. 193-9.
13. Bravo, A., S.S. Gill, and M. Soberon, *Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control*. *Toxicon*, 2007. **49**(4): p. 423-35.
14. Gomez, I., et al., *Specific epitopes of domains II and III of Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in Manduca sexta*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(45): p. 34032-9.
15. Pacheco, S., et al., *Domain II loop 3 of Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin is involved in a "ping pong" binding mechanism with Manduca sexta aminopeptidase-N and cadherin receptors*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(47): p. 32750-7.
16. Gomez, I., et al., *Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin*. *FEBS Lett*, 2002. **513**(2-3): p. 242-6.
17. Atsumi, S., et al., *Location of the Bombyx mori 175kDa cadherin-like protein-binding site on Bacillus thuringiensis Cry1Aa toxin*. *FEBS J*, 2008. **275**(19): p. 4913-26.
18. Pardo-Lopez, L., et al., *Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from Bacillus thuringiensis induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion*. *Biochemistry*, 2006. **45**(34): p. 10329-10336.



19. Schwartz, J.L., et al., *Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of Bacillus thuringiensis through disulfide bond engineering*. FEBS Lett, 1997. **410**(2-3): p. 397-402.
20. Kumar, A.S. and A.I. Aronson, *Analysis of mutations in the pore-forming region essential for insecticidal activity of a Bacillus thuringiensis delta-endotoxin*. J Bacteriol, 1999. **181**(19): p. 6103-7.
21. Girard, F., et al., *Chemical modification of Bacillus thuringiensis Cry1Aa toxin single-cysteine mutants reveals the importance of domain I structural elements in the mechanism of pore formation*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(2): p. 575-80.
22. Parker, M.W. and S.C. Feil, *Pore-forming protein toxins: from structure to function*. Prog Biophys Mol Biol, 2005. **88**(1): p. 91-142.
23. Pardo-Lopez, L., M. Soberon, and A. Bravo, *Bacillus thuringiensis insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection*. FEMS Microbiol Rev, 2013. **37**(1): p. 3-22.
24. Chien, K. *History of Bt Web site* <http://www.bt.ucsd.edu/contact.html>.
25. Tabashnik, B.E., *Insect resistance to Bacillus thuringiensis: uniform or diverse*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci., 1998. **353**(1376): p. 1751–1756.
26. Heckel, D.G., et al., *The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera*. J Invertebr Pathol, 2007. **95**(3): p. 192-7.
27. Huang, F., et al., *Extended monitoring of resistance to Bacillus thuringiensis Cry1Ab maize in Diatraea saccharalis (Lepidoptera: Crambidae)*. GM Crops Food, 2012. **3**(3): p. 245-54.
28. Huang, F., L. Rogers, and W. Xiaoyi, *Resistance of sugarcane borer to Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2007. **124**: p. 117–123.
29. Mahbubur Rahman, M., H.L. Roberts, and O. Schmidt, *Tolerance to Bacillus thuringiensis endotoxin in immune-suppressed larvae of the flour moth Ephestia kuehniella*. J Invertebr Pathol, 2007. **96**(2): p. 125-32.
30. Kaur, P. and V.K. Dilawari, *Inheritance of resistance to Bacillus thuringiensis Cry1Ac toxin in Helicoverpa armigera (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) from India*. Pest Manag Sci, 2011. **67**(10): p. 1294-302.
31. Jinliang, S., et al., *Early resistance of Helicoverpa armigera (Hubner) to Bacillus thuringiensis and its relation to the effect of transgenic cotton lines expressing Bt toxin on the insect*. Acta entomologica sinica, 1998. **41**(1): p. 8-14.
32. Mahon, R., et al., *Environmental stress and the efficacy of BT cotton*. The Australian Cottongrower, 2002. **23**(2): p. 18.
33. Xu, X., L. Yu, and Y. Wu, *Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac {delta}-endotoxin of Bacillus thuringiensis in Helicoverpa armigera*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(2): p. 948-54.
34. Yang, Y., et al., *Mutated cadherin alleles from a field population of Helicoverpa armigera confer resistance to Bacillus thuringiensis toxin Cry1Ac*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(21): p. 6939-44.
35. Gunning, R., et al., *New Resistance Mechanism in Helicoverpa armigera Threatens Transgenic Crops Expressing Bacillus thuringiensis Cry1Ac Toxin*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(5): p. 2558–2563.
36. Ma, G., et al., *Is the mature endotoxin Cry1Ac from Bacillus thuringiensis inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant Helicoverpa armigera larvae?* Insect Biochem Mol Biol, 2005. **35**(7): p. 729-39.



37. Jurat-Fuentes, J.L., et al., *Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from Bacillus thuringiensis*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17606.
38. Caccia, S., et al., *Association of Cry1Ac toxin resistance in Helicoverpa zea (Boddie) with increased alkaline phosphatase levels in the midgut lumen*. Appl Environ Microbiol, 2012. **78**(16): p. 5690-8.
39. Anilkumar, K.J., et al., *Production and characterization of Bacillus thuringiensis Cry1Ac-resistant cotton bollworm Helicoverpa zea (Boddie)*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(2): p. 462-9.
40. Gould, F., et al., *Broad-spectrum resistance to Bacillus thuringiensis toxins in Heliothis virescens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(17): p. 7986-90.
41. Gahan, L., F. Gould, and D. Heckel, *Identification of a gene associated with Bt resistance in Heliothis virescens*. Science, 2001. **293**.
42. Jurat-Fuentes, J.L. and M.J. Adang, *Cry toxin mode of action in susceptible and resistant Heliothis virescens larvae*. J Invertebr Pathol, 2006. **92**(3): p. 166-71.
43. Jurat-Fuentes, J.L., F.L. Gould, and M.J. Adang, *Dual resistance to Bacillus thuringiensis Cry1Ac and Cry2Aa toxins in Heliothis virescens suggests multiple mechanisms of resistance*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(10): p. 5898-906.
44. Jurat-Fuentes, J.L. and M.J. Adang, *Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant Heliothis virescens larvae*. Eur J Biochem, 2004. **271**(15): p. 3127-35.
45. Forcada, C., et al., *Differences in the midgut proteolytic activity of two Heliothis virescens strains, one susceptible and one resistant to Bacillus thuringiensis toxins*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 1996. **31**: p. 257-272.
46. Gahan, L.J., et al., *An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to Bacillus thuringiensis Cry1Ac toxin*. PLoS Genet, 2010. **6**(12): p. e1001248.
47. Fabrick, J.A., L. Forlow Jech, and T.J. Henneberry, *Novel pink bollworm resistance to the Bt toxin Cry 1Ac: effects on mating, oviposition, larval development and survival*. J Insect Sci, 2009. **9**: p. 24.
48. Oppert, B., et al., *Proteinase-mediated insect resistance to Bacillus thuringiensis toxins*. J Biol Chem, 1997. **272**(38): p. 23473-6.
49. Sayyed, A.H., et al., *Cross-resistance between a Bacillus thuringiensis Cry toxin and non-Bt insecticides in the diamondback moth*. Pest Manag Sci, 2008. **64**(8): p. 813-9.
50. Baxter, S.W., et al., *Novel genetic basis of field-evolved resistance to Bt toxins in Plutella xylostella*. Insect Mol Biol, 2005. **14**(3): p. 327-34.
51. Baxter, S.W., et al., *Genetic mapping of Bt-toxin binding proteins in a Cry1A-toxin resistant strain of diamondback moth Plutella xylostella*. Insect Biochem Mol Biol, 2008. **38**(2): p. 125-35.
52. Moar, W.J., et al., *Development of Bacillus thuringiensis CryIC Resistance by Spodoptera exigua (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae)*. Appl Environ Microbiol, 1995. **61**(6): p. 2086-92.
53. Zhang, X., et al., *Resistance of Trichoplusia ni to Bacillus thuringiensis toxin Cry1Ac is independent of alteration of the cadherin-like receptor for Cry toxins*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e35991.
54. Wang, F., et al., *Improvement of crystal solubility and increasing toxicity against Caenorhabditis elegans by asparagine substitution in block 3 of Bacillus thuringiensis crystal protein Cry5Ba*. Appl Environ Microbiol, 2012. **78**(20): p. 7197-204.



55. Andow, D.A., et al., *Frequency of resistance to Bacillus thuringiensis toxin Cry1Ab in an Iowa population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae)*. J Econ Entomol, 2000. **93**(1): p. 26-30.
56. Storer, N.P., et al., *Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico*. J Econ Entomol, 2010. **103**(4): p. 1031-8.
57. Bravo, A. and M. Soberon, *How to cope with insect resistance to Bt toxins?* Trends Biotechnol, 2008. **26**(10): p. 573-9.
58. Oppert, B., *Protease interactions with bacillus thuringiensis insecticidal toxins*. Arch Insect Biochem Physiol, 1999. **42**(1): p. 1-12.
59. Shao, Z., et al., *Processing of delta-endotoxin of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki HD-1 in Heliothis armigera midgut juice and the effects of protease inhibitors*. J Invertebr Pathol, 1998. **72**(1): p. 73-81.
60. Milne, R., et al., *Spruce budworm elastase precipitates Bacillus thuringiensis delta-endotoxin by specifically recognizing the C-terminal region*. Insect Biochem Mol Biol, 1998. **28**(12): p. 1013-23.
61. Ferre, J., et al., *Resistance to the Bacillus thuringiensis bioinsecticide in a field population of Plutella xylostella is due to a change in a midgut membrane receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(12): p. 5119-23.
62. Van Rie, J., et al., *Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide Bacillus thuringiensis*. Science, 1990. **247**(4938): p. 72-4.
63. Tanaka, S., et al., *The ATP-binding cassette transporter subfamily C member 2 in Bombyx mori larvae is a functional receptor for Cry toxins from Bacillus thuringiensis*. FEBS J, 2013.
64. Loeb, M.J., et al., *Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of Bacillus thuringiensis*. J Insect Physiol, 2001. **47**(6): p. 599-606.
65. Shai, Y., *Molecular recognition within the membrane milieu: implications for the structure and function of membrane proteins*. J Membr Biol, 2001. **182**(2): p. 91-104.
66. Tabashnik, B.E., et al., *Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(2): p. 199-202.
67. Yu, X., et al., *Co-expression and synergism analysis of Vip3Aa29 and Cyt2Aa3 insecticidal proteins from Bacillus thuringiensis*. Curr Microbiol, 2012. **64**(4): p. 326-31.
68. Canton, P.E., et al., *Binding of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism*. Peptides, 2011. **32**(3): p. 595-600.
69. Zhao, J., et al., *Transgenic plants expressing two Bacillus thuringiensis toxins delay insect resistance evolution*. Nat Biotechnol, 2003. **21**: p. 1493 - 1497.
70. Soberon, M., et al., *Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance*. Science, 2007. **318**(5856): p. 1640-2.
71. Tabashnik, B.E., et al., *Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(12): p. 1128-31.
72. Wong, H.C., H.E. Schnepf, and H.R. Whiteley, *Transcriptional and translational start sites for the Bacillus thuringiensis crystal protein gene*. J Biol Chem, 1983. **258**(3): p. 1960-7.
73. Bravo, A., et al., *Analysis of cryIAa expression in sigE and sigK mutants of Bacillus thuringiensis*. Mol Gen Genet, 1996. **250**(6): p. 734-41.
74. Dankocsik, C., W.P. Donovan, and C.S. Jany, *Activation of a cryptic crystal protein gene of Bacillus thuringiensis subspecies kurstaki by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity*. Mol Microbiol, 1990. **4**(12): p. 2087-94.



75. Garcia-Gomez, B.I., et al., *Efficient Production of Bacillus thuringiensis Cry1AMod Toxins under Regulation of cry3Aa Promoter and Single Cysteine Mutations in the Protoxin Region*. Appl Environ Microbiol, 2013. **79**(22): p. 6969-73.
76. Du, C., P.A. Martin, and K.W. Nickerson, *Comparison of Disulfide Contents and Solubility at Alkaline pH of Insecticidal and Noninsecticidal Bacillus thuringiensis Protein Crystals*. Appl Environ Microbiol, 1994. **60**(10): p. 3847-53.
77. Hofte, H. and H.R. Whiteley, *Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis*. Microbiol Rev, 1989. **53**(2): p. 242-55.
78. Bietlot, H.P., et al., *Characterization of the cysteine residues and disulphide linkages in the protein crystal of Bacillus thuringiensis*. Biochem J, 1990. **267**(2): p. 309-15.
79. Peng, D., et al., *Single cysteine substitution in Bacillus thuringiensis Cry7Ba1 improves the crystal solubility and produces toxicity to Plutella xylostella larvae*. Environ Microbiol, 2011. **13**(10): p. 2820-31.
80. Salgado-Morales, R., *Tesis Profesional. Construcción y expresión de las toxinas Cry11Aawt y Cry11AaMod delta alfa-1 de Bacillus thuringiensis bajo el promotor de Cry3Aa y determinación de la actividad tóxica en Aedes aegypti*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2013. **Facultad de Ciencias Biológicas**.
81. Bravo, A., Jansens, S. and Peferoen, M., *Immunocytochemical localization of Bacillus thuringiensis insecticidal crystal proteins in intoxicated insects*. Invertebr. Pathol., 1992. **60**: p. 237-246.
82. Aronson, A.I. and P. Fitz-James, *Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat*. Bacteriol Rev, 1976. **40**(2): p. 360-402.
83. Gomez, I., et al., *Bacillus thuringiensis Cry1A toxins are versatile proteins with multiple modes of action: two distinct pre-pores are involved in toxicity*. Biochem J, 2014. **459**(2): p. 383-96.
84. Fabrick, J.A. and B.E. Tabashnik, *Binding of Bacillus thuringiensis toxin Cry1Ac to multiple sites of cadherin in pink bollworm*. Insect Biochem Mol Biol, 2007. **37**(2): p. 97-106.
85. Soon Kim Y., K.K., Kato F., and Murata A., *Effect of the carboxyl-terminal portion of Cry1Ab in Bacillus thuringiensis on toxicity against the silkworm, Bombyx mori*. . Appl. Entomol. Zool., 1998. **33**(3): p. 473-477.