



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**El papel del transportador ABCC2 en el modo de acción de la toxina Cry1Ac  
de *Bacillus thuringiensis* en lepidópteros**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**Doctor en Ciencias**

PRESENTA:

**M. en C. Josué Ocelotl Oviedo**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Mario Soberón Chávez -Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Ernesto Ortiz Suri -Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Humberto Lanz Mendoza -Instituto Nacional de Salud Pública

Ciudad de México, Marzo, 2017



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.

El presente proyecto de investigación se realizó en el Departamento de Microbiología Molecular, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Mario Soberón Chávez. Con el financiamiento de beca CONACyT 332754 y el donativo DGAPA/UNAM IN201515.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Mario Soberón Chavéz por haberme permitido proponer este proyecto y haber depositado su confianza en mí para realizarlo con plena libertad, por sus consejos, observaciones y la oportunidad de continuar mi formación académica bajo su tutela. He disfrutado mucho estos años como miembro de su grupo de investigación, que más que un grupo es un equipo y ha sido mi segunda familia. Mi estancia en el laboratorio me permitió crecer a nivel personal y académico.

A la Dra. Alejandra Bravo por sus aportes y observaciones críticas durante los seminarios que enriquecieron este trabajo. Y por el entusiasmo e interés que muestra en la formación de todos los alumnos que formamos parte del grupo.

A la Dra. Isabel Gómez ya que ella fue quien me guío en mis primeros pasos en el mundo de la investigación, gracias por todas las enseñanzas.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio con quienes compartí el día a día y las dificultades del proyecto, A Biviana, Emiliano y Leivi por las discusiones para intentar desentrañar los misterios del fracaso experimental, y también por compartir el éxito que tanto se anhela en cada experimento. Por su amistad y apoyo moral cuando nada sale. A Arlen, Meztli, Mary Carmen, Fernando, Diana, Ze Yu, Jannette, Sabino, Blanca, Diego, y las Danielas .Gracias por hacer del laboratorio un lugar entretenido para trabajar, por las experiencias, las risas y el bullying académico.

Al biólogo Jorge “Don George” Sánchez por ser un elemento de apoyo indispensable en cuestiones de caracterización bioquímica de toxinas Cry, Por su ojo experto para evaluar la esporulación de los cultivos y su ayuda en cuestiones experimentales.

A Liz Cabrera por cuidar los artrópodos que nos dan trabajo, a Alejandro Uribe, Sergio Blancas y Graciela Domínguez porque con su valiosa labor mantienen

funcionando el laboratorio en medio de todo el caos que genera. Por esas charlas en el cuarto de lavado, las risas y los buenos momentos.

A los miembros de mi comité tutor, el Dr. Ernesto Ortiz Suri, y el Dr. Humberto Lanz Mendoza, gracias a las amenas discusiones, las observaciones críticas y las sugerencias para realizar este proyecto.

A los miembros del jurado de tesis: Dr. Baltazar Becerril, Dra. Patricia León, Dra. Viviana Valadez, Dr. Sergio Encarnación y a la Dra. Cinthia Nuñez por revisar el presente documento y hacer observaciones que permitieron mejorarlo.

A la dirección general de asuntos del personal académico UNAM por el donativo DGAPA/UNAM IN201515 que me permitió concluir este trabajo.

Al Programa de Apoyos de Estudios de Posgrado (PAEP) por los recursos proporcionados para presentar los resultados de este proyecto en los siguientes congresos:

The International Conference on *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis*  
Victoria, Columbia Británica, Canadá, 2013.

XXX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de bioquímica. Guadalajara, Jalisco, México, 2014.

The 29th Annual Symposium of The Protein Society. Barcelona, España, 2015.





## Contenido

Contenido.....	3
Índice de figuras.....	7
Índice de Tablas.....	8
Resumen.....	9
Abstract.....	13
Introducción.....	14
<i>Bacillus thuringiensis</i> y su actividad insecticida .....	15
Toxinas Cry.....	16
Estructura de las toxinas Cry de tres dominios .....	17
Dominio I .....	19
Dominio II .....	19
Dominio III .....	21
Modo de acción de las toxinas Cry .....	21
Interacción de baja afinidad con receptores anclados por GPI.....	22
Interacción con cadherina.....	22
Oligomerización de la toxina.....	22
Interacción de alta afinidad con los receptores anclados por GPI .....	23
Antecedentes .....	24
Moléculas de membrana que funcionan como receptores de toxinas Cry y su papel en el desarrollo de resistencia .....	24
Aminopeptidasa (APN) .....	26
Fosfatasa Alcalina (ALP) .....	27
Cadherina .....	29
Transportador ABCC2 .....	30



Toxinas Cry1A Modificadas (Cry1AMod), una estrategia para contrarrestar el desarrollo de resistencia .....	34
Hipótesis .....	35
Objetivo general .....	35
Objetivos particulares.....	35
Materiales y Métodos .....	36
Cepas bacterianas.....	40
Poblaciones de insectos .....	40
Disección de larvas.....	41
Purificación de VMMA .....	41
Producción y purificación de cristales.....	42
Solubilización y tripsinación de toxinas.....	43
Purificación de toxinas activadas por intercambio iónico.....	44
Cuantificación de proteínas .....	44
Método de Lowry .....	44
Método de Bradford .....	44
Marcaje de toxinas con biotina .....	45
Detección de toxinas biotiniladas .....	45
Ensayo de unión de toxinas a VMMA.....	46
Ensayos de competencia homóloga .....	46
Western Blot Anti-Cadherina .....	46
Expresión del fragmento de cadherina CR7-CR12.....	47

Ensayos de Oligomerización .....	48
Formación de oligómeros .....	48
Inserción de oligómeros.....	49
Asociación de oligómeros pre-formados en solución a VMMA.....	49
Aislamiento de RNA total de larvas de <i>P. xylostella</i> .....	50
Síntesis de DNAC y PCR para comprobar la mutación en el transportador ABCC2 de <i>P. xylostella</i> .....	50
Secuenciación de DNA.....	52
Resultados .....	53
Detección del receptor cadherina en poblaciones resistentes de <i>P. gossypiella</i> y <i>P. xylostella</i> .....	54
Confirmación del alelo mutante <i>abcc2</i> en la línea resistente NO-QAGE de <i>P.xylostella</i> .....	57
Análisis de unión de las toxinas Cry1Ac y Cry1Ac Mod a VMMA de líneas susceptibles y resistentes de <i>P. gossypiella</i> y <i>P. xylostella</i> .....	58
Análisis de oligomerización de la toxina Cry1Ac en VMMA de las líneas susceptibles y resistentes de <i>P. gossypiella</i> y <i>P. xylostella</i> .....	61
Asociación de Oligómeros de la toxina Cry1Ac pre-formados en solución a VMMA de las líneas susceptible y resistente de <i>P. xylostella</i> .....	66
Análisis de oligomerización de la toxina Cry1AcMod en VMMA de la líneas susceptibles y resistentes de <i>P. gossypiella</i> y <i>P. xylostella</i> .....	70
Discusión.....	72
Conclusiones.....	83
Literatura citada: .....	84

ANEXO I: Publicaciones derivadas de este trabajo ..... 100

## Índice de figuras

Figura 1. Espectro y especificidad de las toxinas Cry.....	17
Figura 2. Estructura cristalina de las toxinas Cry.....	18
Figura 3. Topología estructural de los dominios funcionales de las toxinas Cry.....	21
Figura 4 Modo de acción de las toxinas Cry1A en lepidópteros.....	23
Figura 5 Mecanismos de Resistencia a las toxinas Cry.....	25
Figura 6 Estructura general de transportadores ABC.....	32
Figura 7 Deleción en el exón 20 del gen del transportador ABCC2.....	51
Figura 8 . Western blot anti-cadherina en VMMA de líneas susceptibles y resistentes de <i>P. gossypiella</i> y <i>P. xylostella</i> .....	53
Figura 9 Amplificación del exón 20 del gen del transportador ABCC2 en las líneas susceptible y resistente de <i>P. xylostella</i> .....	57
Figura 10 Purificación de las toxinas Cry1Ac y Cry1AcMod.....	59
Figura 11 Unión de la toxinas Cry1Ac silvestre y Cry1AcMod a VMMA de líneas susceptibles y resistentes de <i>P. gossypiella</i> y <i>P. xylostella</i> .....	60
Figura 12 Esquema experimental del análisis de formación e inserción de oligómeros .....	62
Figura 13 Oligomerización de la toxina Cry1Ac en VMMA de líneas susceptibles y resistentes de <i>P. gossypiella</i> y <i>P. xylostella</i> .....	63
Figura 14 Inserción de oligómeros de la toxina Cry1Ac en VMMA de líneas susceptibles y resistentes de <i>P. gossypiella</i> y <i>P. xylostella</i> .....	65
Figura 15 Purificación y expression del fragmento de cadherina CR7-CR12 de <i>M. sexta</i> .....	67

Figura 16 Inserción de oligómeros preformados en VMMA de las líneas susceptible y resistente de <i>P. xylostella</i> .....	69
Figura 17 Oligomerización de la toxina Cry1AcMod en las poblaciones susceptibles y resistentes de <i>P. xylostella</i> y <i>P. gossypiella</i> .....	71
Figura 18 Papel diferencial de receptores que promueven oligomerización en el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ac.. .....	82

## Índice de Tablas

Tabla I. Soluciones .....	36
Tabla II. Medios de cultivo .....	39
Tabla III. Oligonucleótidos .....	51
Tabla IV. Condiciones de la PCR .....	52
Tabla V. Poblaciones de insectos .....	54

## Abreviaturas

ABCC2: ATP binding cassette (cassette de unión a adenosín trifosfato) subfamilia C, miembro 2.

ALP: fosfatasa Alcalina

APN: aminopeptidasa

ATP: trifosfato de adenosina

Bin: toxina binaria

BSA: albúmina de suero bovino

Bt: *Bacillus thuringiensis*

CaCl<sub>2</sub>: cloruro de calcio

cDNA: ácido desoxiribonucleico complementario

C-terminal: extremo carboxilo terminal

CR7-CR12: Repetido de Cadherina 7 al 12

Cry: proteína cristalina

Cry1AcMod: Cry1Ac modificada

DNA: ácido desoxirribonucleico

D.O.: densidad

DTT: ditioneitol

ETX-MTX: toxina epsilon-toxina mosquiticida

GPI: glicosilfosfatidilinositol

IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

kDa: kilo daltones

LB: Luria Bertani

MRP: proteína de resistencia multidrogas

NBD: nucleotide binding domain (dominio de unión a nucleótido)

N-terminal: extremo amino terminal

pb: pares de bases

PBS: buffer salino de fosfatos

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PVDF: polifluoruro de vinilideno

RNA: ácido ribonucleico

RNAm: ácido ribonucleico mensajero

RPM: revoluciones por minuto

SDS: dodecil sulfato de sodio

Sip: proteína insecticida secretada

TM: hélice transmembranal

TTN: Tritón/Tris/Cloruro de Sodio

Vip: proteínas insecticidas vegetativas

VMMA: vesículas de la microvellosidad media apical

## Resumen

*Bacillus thuringiensis* produce proteínas con actividad insecticida denominadas toxinas Cry, las cuales son usadas ampliamente como una alternativa a los insecticidas químicos. Para ejercer su efecto tóxico, las toxinas Cry1A establecen interacciones secuenciales con diversas proteínas de membrana; siendo cadherina una de las más estudiadas. La interacción con cadherina promueve la oligomerización de la toxina mediante un cambio conformacional que favorece el procesamiento de una porción del N-terminal que incluye la hélice  $\alpha$ -1. El complejo oligomérico interacciona con APN y ALP para insertarse en la membrana formando un poro que provoca la lisis de las células del intestino de la larva susceptible. Mutaciones en el gen de cadherina provocan resistencia a las toxinas Cry en tres diferentes especies de insectos lepidópteros. Recientemente se reportó que mutaciones en el transportador ABCC2 están ligadas genéticamente a la resistencia a la toxina Cry1Ac en distintas especies de lepidópteros y se propuso que la unión a ABCC2 facilita la inserción del oligómero a la membrana. No obstante la toxina Cry1Ac Modificada (Cry1AcMod) que carece de la hélice  $\alpha$ -1 y es capaz de formar oligómeros en ausencia de cadherina, puede superar la resistencia a la toxina Cry1Ac en insectos con diferentes mecanismos de resistencia como mutaciones en el gen ABCC2 de *Plutella xylostella* o mutaciones en cadherina en *Pectinophora gossypiella*. Para elucidar el papel del transportador ABCC2 en la toxicidad de Cry1Ac, analizamos y comparamos la unión y oligomerización de las toxinas Cry1Ac silvestre y Cry1AcMod a vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA) de poblaciones susceptibles y resistentes de *P. xylostella* y *P. gossypiella* ligadas a mutaciones en ABCC2 o cadherina respectivamente. En ambas especies de insectos, la resistencia correlaciona con una disminución en la eficiencia de oligomerización de la toxina Cry1Ac. En contraste la toxina Cry1AcMod fue capaz de formar oligómeros que se asocian a las VMMA de las poblaciones resistentes de ambos insectos. Adicionalmente comparamos la asociación de oligómeros de la toxina Cry1Ac preformados en presencia de un fragmento de cadherina de *Manduca sexta*, a VMMA de las poblaciones susceptible y resistente de *P. xylostella*. Los oligómeros



preformados se asocian con una menor eficiencia a las VMMA de la población resistente (mutante en ABCC2) en comparación con la población susceptible, indicando que la mutación en el transportador ABCC2 también afecta la inserción del oligómero de la toxina Cry1Ac en la membrana. Nuestros resultados demuestran por primera vez que el transportador ABCC2 facilita la oligomerización e inserción de la toxina Cry1Ac en *P. xylostella*.

## Abstract

*Bacillus thuringiensis* produces insecticidal proteins known as Cry toxins which are widely used as an alternative to chemical insecticides. To exert their toxic effect, Cry1A toxins undergo sequential binding with different membrane proteins, such as cadherin which has been studied extensively, interaction with cadherin promotes oligomerization of Cry toxins through a conformational change that favors the proteolytic cleavage of a portion of the N-terminal that includes  $\alpha$ -1 helix, followed by an interaction with APN and ALP which promotes membrane insertion of the oligomeric complex, this results in the formation of a pore that culminates with the lysis of the midgut cells of susceptible larvae. Mutations in the cadherin gene are linked to resistance in at least three lepidopteran species. Recently it was reported that resistance to Cry1Ac toxin is genetically linked to mutations in the ABCC2 transporter in different lepidopteran species and it was proposed that ABCC2 binding facilitates the insertion of the toxin oligomer in the membrane. However Cry1Ac Modified (Cry1AcMod) toxin, which is able to form oligomers without cadherin binding due to lacking  $\alpha$ -1 helix, countered Cry1Ac resistance in insects with different resistance mechanisms such as *Plutella xylostella* linked to ABCC2 mutation or in *Pectinophora gossypiella* linked to cadherin mutations. To elucidate the role of the ABCC2 transporter in Cry1Ac toxicity, we analyzed and compared binding and oligomerization of Cry1Ac and Cry1AcMod toxins to BBMV isolated from susceptible and resistant populations of *P. xylostella* and *P. gossypiella* in which resistance is linked to mutations in ABCC2 transporter and cadherin respectively. In both insect species, resistance correlated with lower oligomerization efficiency of Cry1Ac toxin. In contrast Cry1AcMod toxin was able to form oligomers that associate to BBMV from both resistant populations. Furthermore, we compared the association of Cry1Ac oligomers preformed in presence of a *Manduca sexta* cadherin fragment between the susceptible and resistant strains of *P. xylostella*. Preformed Cry1Ac oligomers associate with less efficiency to BBMV from the resistant strain when compared with the susceptible strain, indicating that ABCC2 mutations also affect oligomer insertion. These data indicate, for the first time, that ABCC2 facilitates Cry1Ac toxin oligomerization and oligomer membrane insertion in *P. xylostella*.

## Introducción

De los 150 millones de km<sup>2</sup> que conforman la superficie terrestre, solo el 10% se utiliza para producción agrícola, 55% sostiene prados, pasturas y bosques, el porcentaje restante no es adecuado para la agricultura (Devine & Furlong, 2007). Durante los próximos 35 años, la agricultura hará frente a una confluencia sin precedentes de presiones, entre ellas el aumento del 30 por ciento de la población mundial, la intensificación de la competencia por unos recursos de tierra, agua y energía cada vez más escasos. Para alimentar a una población que se estima que alcance los 9 300 millones de personas en 2050 y apoyar los cambios en los hábitos alimenticios, se estima que la producción de alimentos deberá pasar de los 8 400 millones de toneladas actuales a casi 13 500 millones de toneladas por año (<http://www.fao.org/sustainability/background/es/>).

Los cultivos agrícolas de consumo humano son dañados por más de 10,000 especies de insectos que provocan pérdidas importantes en la producción de alimentos en el campo así como su almacenamiento (Akoijam et al., 2014). Previo a la introducción de los insecticidas químicos los agricultores carecían de herramientas adecuadas para combatir las plagas de insectos, lo cual provocaba pérdidas considerables en el rendimiento de producción. La introducción del DDT después de la segunda guerra mundial en la agricultura representó un método efectivo para el control de plagas agrícolas, ya que era un insecticida muy efectivo, con un amplio espectro de acción y con una larga actividad residual en el ambiente. Sin embargo estas ventajas también tenían un impacto negativo ya que al acumularse en el ambiente los insecticidas químicos afectaban a organismos benéficos en la cadena trófica (Wheeler, 2002). En este contexto las consecuencias ecológicas del uso de insecticidas químicos han generado un gran preocupación (Devine & Furlong, 2007) . Esto ha llevado a la búsqueda de alternativas que sean amigables con el ambiente además de efectivas y específicas. Los biopesticidas representan una opción sustentable ya que se derivan organismos naturales y sus productos y se emplean para el control de plagas

(Nicholson, 2007). Uno de los biopesticidas que se emplean ampliamente con gran éxito es una bacteria que produce distintas proteínas las cuales matan de manera específica a diversas especies de insectos.

### ***Bacillus thuringiensis* y su actividad insecticida**

*B. thuringiensis* (Bt) fue identificado por primera vez en 1902 por Ishiwata, quien reportó el microorganismo que infectaba al gusano de seda *Bombyx mori* y que causó gran daño en la industria de la seda de Japón. El autor llamó a esta bacteria *Bacillus sotto*, que significa suave y flácido, en referencia al aspecto que adquirirían las larvas infectadas. Subsecuentemente en la ciudad de Thuringia en Alemania, Berliner aisló una bacteria gram positiva de larvas de la polilla *Ephestia kuehniella*, ignorando la nomenclatura de Ishiwata, la llamó *B. thuringiensis* que es el nombre que persiste hasta hoy en día (Melo et al., 2016). Esta bacteria es un miembro de la familia *Bacillaceae* y pertenece al grupo de *Bacillus cereus*. Esporas de Bt se han aislado en diversos ambientes como el suelo, la rizósfera, agua, en la superficie de hojas de plantas, cadáveres de insectos, etc (Raymond et al., 2010). A pesar de que Berliner demostró los efectos tóxicos de la ingestión continua de la bacteria, llevando a la muerte de los insectos, nunca consideró su aplicabilidad para el control de larvas de polillas, ya que se sabía poco sobre las características y el potencial de esta bacteria. El microorganismo fue aislado nuevamente en 1927 y se utilizó en los años subsecuentes para el control biológico de *Ostrinia nubilalis*. La primera formulación de un biopesticida basado en Bt surgió en la década posterior y el producto conocido como Sporeine se utilizó para el control de diversas plagas de lepidópteros que afectaban diversos cultivos en Francia (Melo et al., 2016) .

Fue hasta 1956 que T. Angus demostró que las inclusiones proteicas formadas durante el proceso de esporulación de la bacteria eran las responsables de la actividad entomocida de Bt (Angus, 1956). Para principios de la década de 1980 se descubrió que los genes que codifican para las proteínas cristalinas se localizaban en plásmidos transmisibles entre las cepas de Bt (González et al, 1982), lo cual llevo a su clonación y

subsecuente caracterización. Se han identificado más de 700 genes que codifican para proteínas Cry que incluyen a las proteínas Vip, Sip, toxinas Binarias (Bin) y toxinas similares a las ETX-MTX producidas por *Lysinbasillus sphaericus*, sin embargo el grupo más grande y mejor caracterizado está conformado por las llamadas toxinas Cry de tres dominios (Palma et al., 2014).

### **Toxinas Cry de tres dominios**

La clasificación de una proteína como una toxina Cry deriva del hecho de que forman un cristal paraesporal durante la fase de esporulación. Las proteínas Cry de tres dominios constituyen el grupo más amplio de proteínas insecticidas producidas por especies de *Bacillus*. Actualmente se han clasificado 73 tipos diferentes de toxinas Cry de tres dominios (Cry1 a Cry73) y se ha documentado la actividad tóxica de algunas de ellas en contra de lepidópteros, coleópteros, hemípteros, himenópteros, dípteros, nematodos, rhabditidos e incluso algunas líneas celulares humanas derivadas de cáncer (Figura 1, Palma et al., 2014).

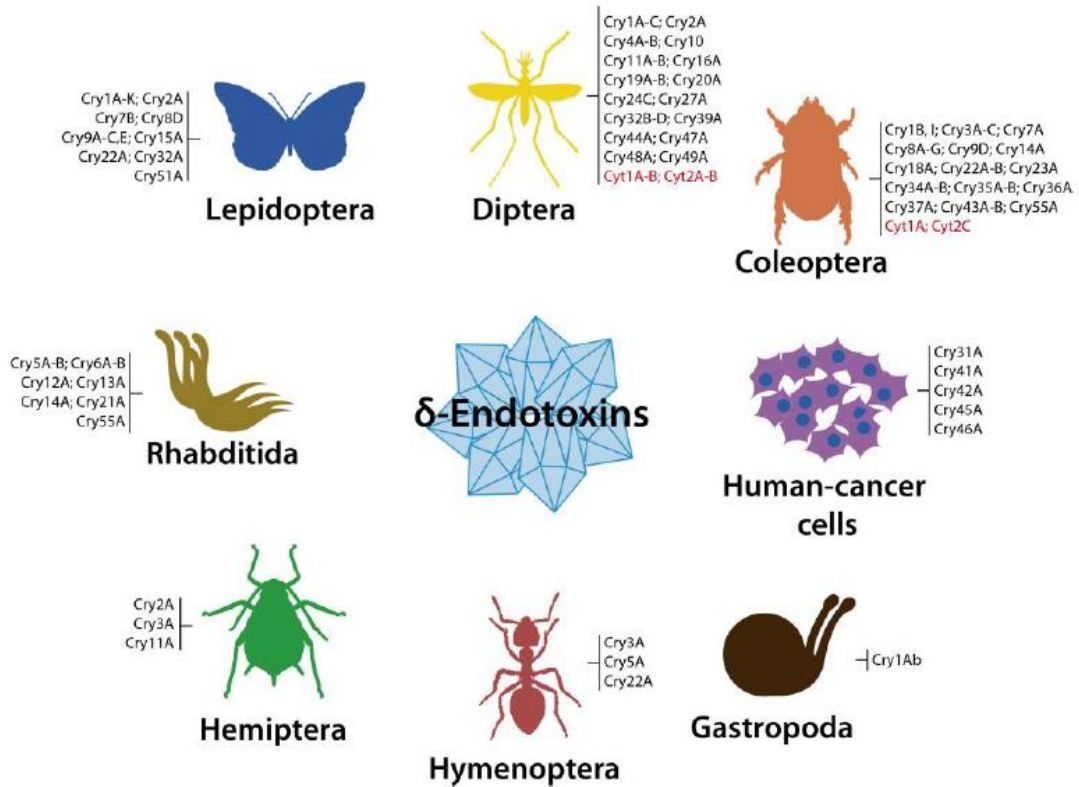


Figura 1. Espectro y Especificidad de las toxinas Cry. Tomado de (Palma et al., 2014)

## Estructura de las toxinas Cry de tres dominios

Mediante el uso de cristalografía de rayos X se ha logrado determinar la estructura de ocho diferentes toxinas Cry activadas con tripsina, que poseen actividad insecticida contra distintos órdenes de insectos; Cry1Aa (lepidóptera), Cry2Aa (díptera/lepidóptera), Cry3Aa (coleóptera), Cry3Bb (coleóptera), Cry4Aa (díptera), Cry4Ba (díptera), Cry5Ba (nemátodos) y Cry8Ea (coleópteros) (Boonserm et al., 2005; Boonserm et al., 2006; Galitsky & Cody, 2005; Grochulski et al., 1995; S. Guo et al., 2009; Hui et al., 2012; Li, et al., 1991; Morse et al., 2001). El análisis de estas estructuras muestra que a pesar de la baja identidad en secuencia entre estas

proteínas y las diferencias en especificidad, la topología general de los tres dominios estructurales que conforman a estas toxinas es muy similar (Figura 2).

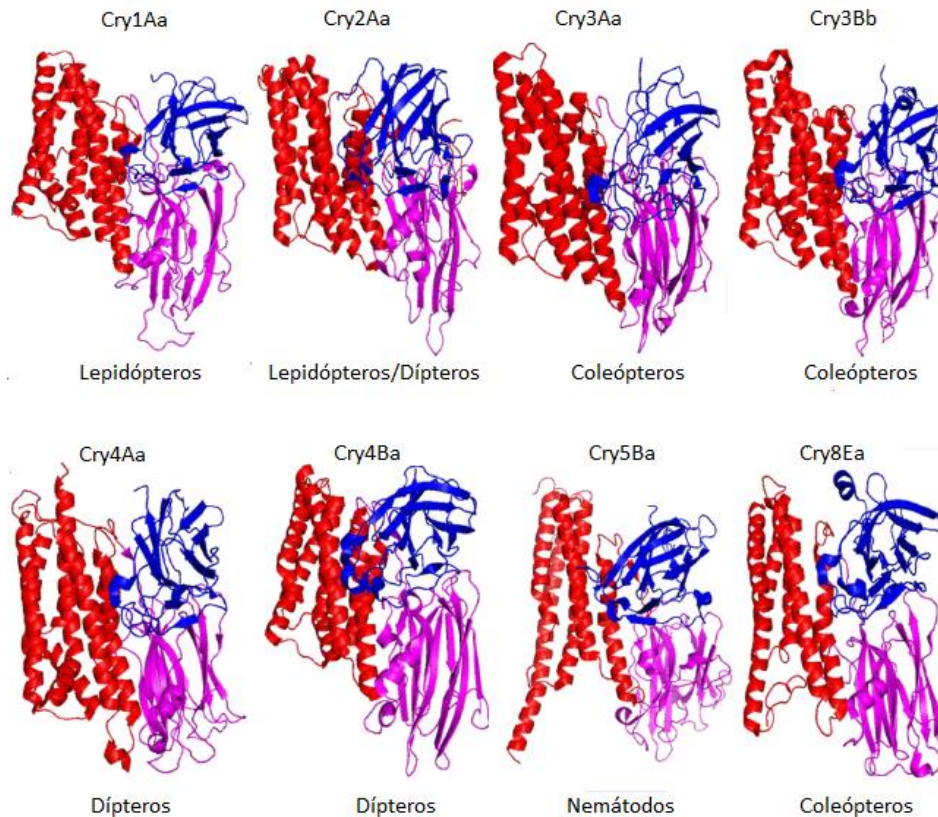


Figura 2. Estructuras cristalinas de las toxinas Cry resueltas a la fecha, los dominios I, II y III se muestran en rojo, magenta y azul respectivamente. Cry1Aa (PDB ID: 1CIY), Cry2Aa (PDB ID: 1I5P), Cry3Aa (PDB ID: 1DLC), Cry3Bb (PDB ID: 1JI6), Cry4Aa (PDB ID: 2C9K), Cry4Ba (PDB ID: 1W99), Cry5B (PDB ID: 4D8M) y Cry8Ea (PDB ID: 3EB7)

Dado que existe un alto grado de conservación estructural, se ha propuesto que el modo de acción de estas toxinas podría ser similar en diferentes insectos (Bravo, Gill, & Soberón, 2007). Estudios de la relación estructura función de las toxinas Cry, han permitido determinar la función de cada uno de los durante su mecanismo de acción.

## **Dominio I**

Corresponde a la porción N-terminal de la proteína y está formado por un ramillete de 7  $\alpha$ -hélices, en el cual 6 de ellas rodean a una hélice central de carácter hidrofóbico ( $\alpha$ -5). Las hélices externas tienen un carácter anfipático y se conforman por aminoácidos cargados o polares que miran hacia la cara interna de frente a la hélice  $\alpha$ -5, mientras que aminoácidos hidrofóbicos se orientan hacia la cara opuesta (Figura 3A). La longitud de la mayor parte de las hélices es mayor a 30 Å y en consecuencia son capaces de atravesar una membrana, adicionalmente el dominio I presenta una gran parecido estructural con otras toxinas bacterianas formadoras de poro como la de difteria y la de colicina A (Boonserm et al., 2006; Bravo et al., 2007). El análisis mediante mutagénesis sitio dirigida ha permitido determinar que este es el dominio involucrado en la oligomerización de la toxina (Jiménez-Juárez et al., 2007), así como en la inserción de una región discreta en la membrana que comprende las hélices  $\alpha$ 4 y  $\alpha$ 5, que finalmente resulta en la formación de un poro que provoca la lisis celular (Zavala et al., 2011).

## **Domino II**

Este dominio está compuesto por tres láminas  $\beta$  antiparelelas que forman una estructura denominada prisma  $\beta$  (Figura 3B), cada lámina termina en un asa expuesta al solvente, las similitudes entre el ápice de este dominio y la región determinante de complementaridad de anticuerpos, así como la gran variabilidad en longitud, conformación y secuencia que presente esta región, llevaron a hipotetizar que este dominio se involucraba en la unión a moléculas de membrana que funcionan como receptores (Boonserm et al., 2006; J. D. Li et al., 1991). Esto fue comprobado mediante estudios de mutación sitio dirigida, logrando definir que los aminoácidos que conforman las asas de las toxinas Cry1A son esenciales en la actividad entomocida. Con base en estos estudios se definió que el dominio II juega un papel estableciendo interacciones importantes con moléculas que se encuentran en la membrana de la célula blanco, ya que al mutar distintos residuos la interacción con moléculas receptoras se ve afectada y



en consecuencia ocurre una pérdida de la toxicidad (Arenas, et al., 2010; Pacheco, et al., 2009).

### **Dominio III**

El dominio III corresponde a la región C-terminal y está compuesto por dos láminas  $\beta$  antiparalelas que se empacan una contra la otra adquiriendo una conformación de emparedado  $\beta$  (Figura 3C). Ambas láminas están formadas por 5 hebras  $\beta$ , una de las láminas queda expuesta al medio acuoso, mientras que la otra se empaca contra el dominio II, dos asas largas se extienden desde un extremo del dominio e interaccionan con el dominio I (Boonserm et al., 2006). Este dominio es el menos variable en cuanto a la estructura y las principales diferencias que se observan se encuentran en la longitud y orientación de las asas. Adicionalmente, dicho dominio muestra similitudes estructurales con proteínas de unión a carbohidratos como la 1,4- $\beta$  glucanasa C, galactosa oxidasa, sialidasa,  $\beta$ -glucuronidasa y el dominio de unión a carbohidratos de la  $\beta$ -galactosidasa (de Maagd, Bravo, Berry, Crickmore, & Schnepf, 2003). No obstante, solo se ha reportado la unión a receptor dependiente de carbohidratos en la toxina Cry1Ac. Se ha demostrado que el dominio III también es un determinante de la especificidad de las toxinas Cry por su insecto blanco (Herrero et al., 2004). Además de que se ha determinado que el dominio III juega un papel importante en la interacción con receptores ya que al introducir mutaciones en este dominio ocurre una pérdida de toxicidad que correlaciona con la abolición de la unión a APN y ALP en *M. sexta*. (Arenas et al., 2010)

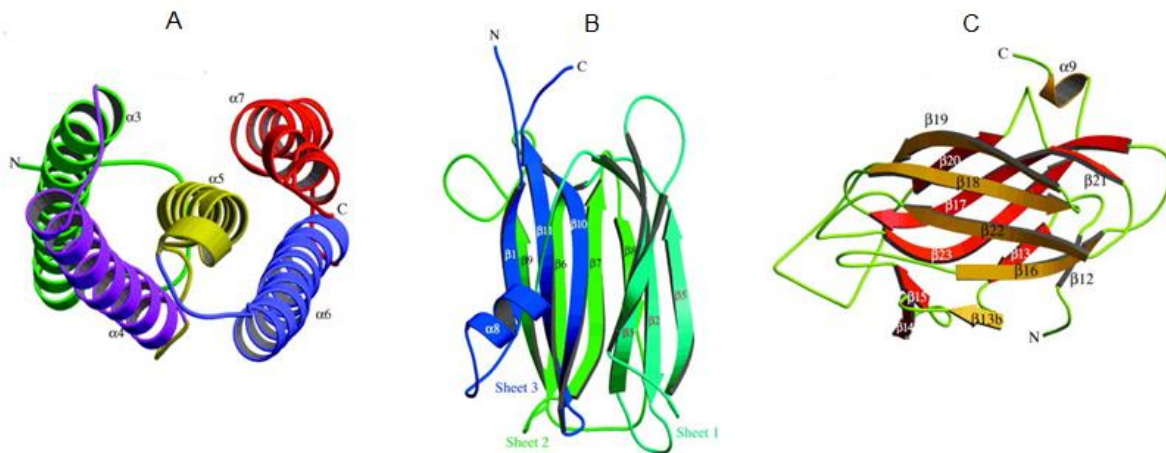


Figura 3. Topología estructural de los dominios funcionales de las toxinas Cry activadas. A) Dominio I B) Dominio II y C) Dominio III. Modificado de Boonserm et al., 2005.

### Modo de acción de las toxinas Cry

Las proteínas Cry son toxinas formadoras de poro cuya acción primaria es la lisis de las células del epitelio del intestino medio de la larva susceptible. Este proceso se ha estudiado principalmente en insectos del orden lepidóptera y se ha descrito a detalle para las toxinas Cry1A (Bravo et al., 2007). El modo de acción consiste de una serie de pasos secuenciales que inician con la solubilización del cristal debido al pH alcalino y condiciones reductoras presentes en el intestino del insecto, y el subsecuente procesamiento proteolítico de la protoxina por proteasas presentes en el jugo gástrico para dar lugar a la toxina activa. Posteriormente ocurren diversos eventos de interacción entre receptores presentes en la membrana de la célula blanco y la toxina, los cuales se describen a continuación.

### **Interacción de baja afinidad con receptores anclados por GPI:**

Se ha propuesto que la interacción inicial de la toxina Cry1Ab con los receptores APN y ALP de *M. sexta* ocurre a través de residuos presentes en asa 3 del dominio II y la cadena  $\beta$ 16 del dominio III. Estas moléculas se encuentran en gran abundancia en balsas lipídicas de la membrana de la célula blanco debido a la presencia de un ancla de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) y poseen una baja afinidad por la toxina (Arenas et al., 2010; Gómez et al., 2006; Pacheco, Gómez, Arenas, et al., 2009)( Bravo et al., 2004). La interacción de la toxina con estos receptores permite su concentración sobre la superficie celular (Figura 4:1).

### **Interacción con cadherina:**

La interacción de baja afinidad con los receptores anclados por GPI es seguida por un evento de unión de alta afinidad al receptor cadherina, la cual es una molécula poco abundante en la membrana. Esta interacción es compleja ya que involucra a tres epitopes presentes en la cadherina que corresponden a las regiones extracelulares que comprenden los repetidos CR7, CR11 y CR12, siendo esta última región la más proximal a la membrana de la célula. Este evento de interacción resulta en la eliminación de la hélice  $\alpha$ -1 como se ilustra en la Figura 4:2 (Gómez et al., 2002; Gómez et al., 2006).

### **Oligomerización de la toxina:**

El procesamiento de la hélice  $\alpha$ -1 expone regiones hidrofóbicas del dominio I que al quedar expuestas al solvente, facilitan la formación de un complejo pre-poro oligomérico (Figura 4:3) que es competente para insertarse en la membrana (Gómez et al., 2002). La oligomerización es un paso crucial para la toxicidad de las proteínas Cry ya que se ha demostrado que mutantes de la toxina Cry1Ab que son incapaces de oligomerizar, pierden la actividad tóxica en contra de *M. sexta* (Jiménez-Juárez et al., 2007).

### Interacción de alta afinidad con los receptores anclados por GPI:

La estructura oligomérica de la toxina Cry1Ab gana una gran afinidad a través de la interacción del asa 2 del dominio II con los receptores anclados por GPI, APN y ALP en *M. sexta* (Arenas et al., 2010). La unión del oligómero a los receptores anclados por GPI permite su localización en balsas lipídicas (Figura 4:4), resultando en la inserción en la membrana y la formación de poros, provocando un choque osmótico que culmina con la lisis de la célula y la eventual muerte del insecto (Figura 4:5, Pardo-López et al., 2013).

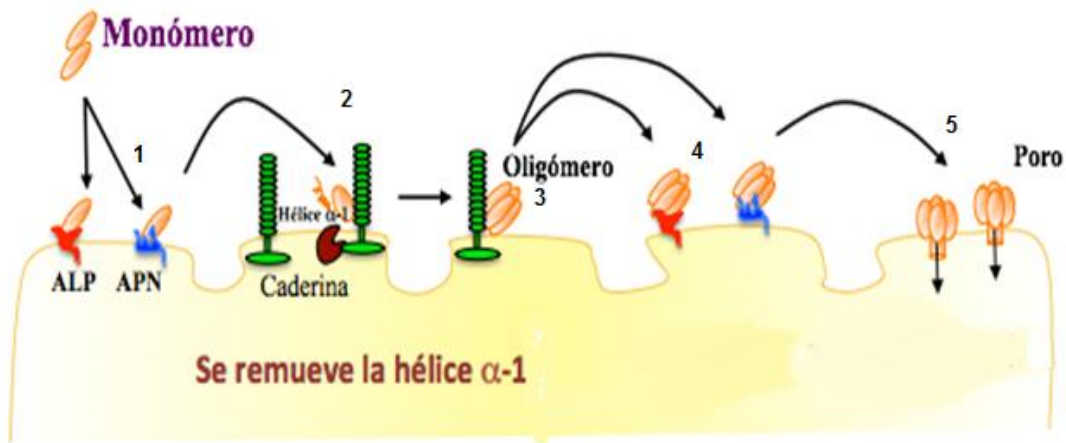


Figura 4. Modo de acción de las toxinas Cry1A en lepidópteros.

## Antecedentes

### **Moléculas de membrana que funcionan como receptores de toxinas Cry y su papel en el desarrollo de resistencia**

Una de las características más interesantes de las toxinas Cry es su especificidad por su insecto blanco, que está determinada en gran parte por las proteínas que establecen interacción con las toxinas Cry. Estas proteínas de unión se localizan en la superficie de la microvellosidad de las células del intestino de las larvas susceptibles. Después de que se demostró la existencia de sitios de unión de toxinas Cry que eran específicos y de alta afinidad, se invirtieron grandes esfuerzos en la identificación y clonación de estos receptores de toxinas Cry (Pigott & Ellar, 2007). En el caso de lepidópteros se han identificado una variedad de proteínas que son capaces de unir a toxinas Cry1, dentro de los receptores putativos de toxinas Cry se encuentran aquellos anclados por GPI: APN y ALP, el receptor tipo cadherina y el transportador ABCC2 (Pardo-López et al., 2013; Pigott & Ellar, 2007; Tanaka et al., 2013; Zhou et al., 2016). La identificación de estas moléculas se ha realizado mediante técnicas *in vitro* como purificación por cromatografía de afinidad, inmunoprecipitación, ensayos de unión a ligando y en años recientes mediante estudios de proteómica. No obstante su papel en el mecanismo de acción ha sido validado mediante el estudio de poblaciones de insectos que han desarrollado resistencia a las toxinas Cry. En teoría, la resistencia a las toxinas Cry puede ocurrir al bloquear algún paso del mecanismo de acción. La selección de poblaciones resistentes de insectos en laboratorio ha demostrado que la resistencia puede desarrollarse mediante diferentes mecanismos como son alteraciones en la activación de las toxinas Cry por proteasas del tracto digestivo (Keller et al., 1996; H. Li et al., 2004; Oppert et al., 1997), el secuestro de la toxina por glicolípidos (Ma et al., 2012) o esterases (Gunning et al., 2005), o por la inducción de una respuesta inmune elevada (Hernández-Martínez et al., 2010; Rahman et al., 2004). Sin embargo, la interrupción de la unión de las toxinas Cry a receptores del intestino medio es el mecanismo de resistencia más común (Ferré & Van Rie, 2002). En

diferentes especies de insectos, los mecanismos genéticos de resistencia a toxinas Cry incluyen mutaciones por delección en los genes de cadherina, APN, ALP o las recientemente descritas mutaciones en el transportador ABCC2, o mutaciones que afectan su expresión (Figura 5). Las cuales se discuten a continuación.

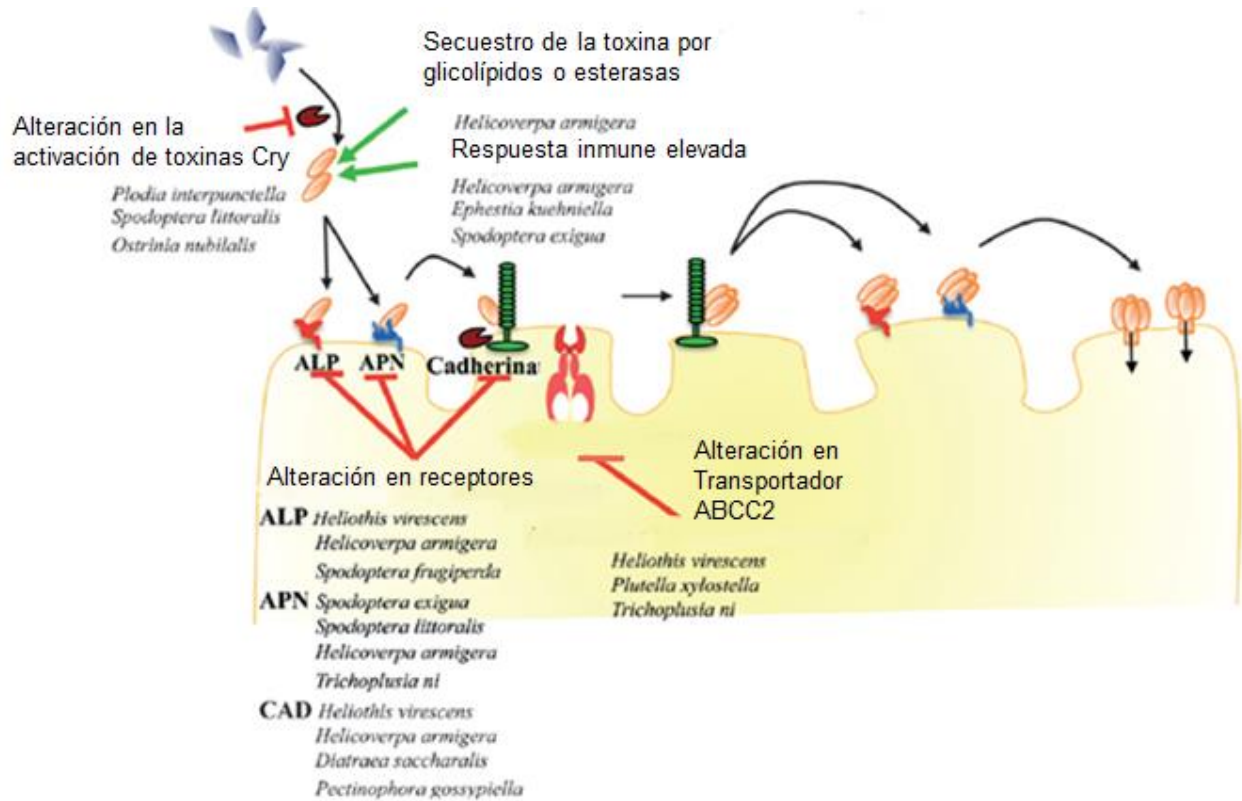


Figura 5. Representación esquemática de los diferentes mecanismos de resistencia a las toxinas Cry, Modificado de Pardo-López et al., 2013.

## Aminopeptidasa (APN)

La familia de APN está compuesta por una clase de enzimas que cortan aminoácidos neutrales del N-terminal de polipéptidos. Cumplen una variedad de funciones en un amplio espectro de diferentes especies, pero en el intestino medio de las larvas de lepidópteros, trabajan en cooperación con endopeptidasas y carboxipeptidasas para digerir las proteínas derivadas de la dieta del insecto (Wang, Zhang, & Zhang, 2005). Estas proteínas se encuentran en gran abundancia en la membrana apical de las células del epitelio intestinal y en lepidópteros se han identificado al menos cuatro isoformas de esta enzima (Nakanishi et al., 2002). Una característica importante de estas proteínas es que en comparación con vertebrados, donde la proteína se encuentra embebida en la membrana a través de un tallo hidrofóbico localizado en el N-terminal, las APNs de lepidópteros poseen un ancla de GPI (Pigott & Ellar, 2007). Además de ser estudiadas por su papel en la digestión, las APNs han sido estudiadas como receptores de toxinas Cry.

La APN representó la primera molécula que se identificó por su capacidad de interacción con las toxinas Cry, siendo descrita como receptor de la toxina Cry1Ac en *M. sexta* (Knight et al., 1994). A partir de entonces, se han descrito diversas APNs de lepidópteros como proteínas de unión a las toxinas Cry1A, identificadas a partir de la afinidad de la toxina por esta enzima en *Helicoverpa armigera* (Rajagopal, 2003), *P. xylostella* y *B. mori* (Nakanishi et al., 2002).

La validación de la APN como un receptor funcional en el mecanismo de acción de las toxinas Cry se ha realizado mediante diversos enfoques. Por ejemplo, al alimentar con la toxina CryAc a larvas transgénicas de *Drosophila melanogaster*, que expresan a la APN1 de *M. sexta*, se observó toxicidad, en comparación a larvas control las cuales no presentaron susceptibilidad frente al reto con la toxina (Gill & Ellar, 2002). Se ha obtenido evidencia adicional mediante estudios de silenciamiento en distintos lepidópteros. Empleando RNA de doble cadena se silenció el gen de la APN4 de *Spodoptera litura*, que resultó en una disminución del 80% en la expresión de la proteína, al exponer larvas silenciadas a la toxina Cry1Ca se observó una reducción del

75% en la mortalidad (Rajagopal et al., 2002). En *Diatraea saccharalis*, se demostró que el silenciamiento de tres isoformas de APN resulta en un fenotipo de tolerancia a la toxina Cry1Ab (Yang et al., 2010). Adicionalmente recientemente se reportó que el silenciar la APN1 de *M. sexta* se genera tolerancia frente al reto con las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac (Flores-Escobaret al., 2013).

La implicación de APN en el mecanismo de acción también se ha confirmado mediante la caracterización de poblaciones de insectos resistentes que presentan mutaciones en este receptor. El primer lepidóptero cuya resistencia se asoció a mutaciones en APN fue *Spodoptera exigua*, en este caso se determinó que la falta de expresión de APN1 correlaciona con altos niveles de resistencia a la toxina Cry1C (Herrero et al., 2005). Posteriormente en *H. armigera* se demostró que una mutación por delección en el gen de APN1 confería resistencia a la toxina Cry1Ac ( Zhang et al., 2009). En otro reporte se encontraron dos mutaciones en el gen de la aminopeptidasa-P de *O. nubilalis* que se asocian a resistencia frente al reto con la toxina Cry1Ab y el papel de esta proteína en el mecanismo de acción se corroboró mediante RNA de interferencia con larvas en las que el gen *onnap* fue silenciado presentando una tolerancia a la intoxicación con Cry1Ab (Khajuria et al., 2011). Por otra parte, la población resistente GLEN-Cry1Ac-BCS de *Trichoplusia ni* presenta una disminución en la expresión a nivel de transcrito y proteína de APN1 comparado con la población susceptible. Esta regulación negativa del gen de APN1 se encuentra ligada genéticamente al fenotipo de resistencia, sin embargo no existen mutaciones en el gen *apn1*, lo cual sugirió que una mutación adicional es la responsable de la disminución en la expresión de APN1 por un mecanismo de modificación post-traducciona (Tiewisiri & Wang, 2011).

### **Fosfatasa Alcalina (ALP)**

La familia de fosfatasas alcalinas la conforman enzimas con actividad de hidrolasa/transferasa, cuya actividad catalítica depende de la presencia de  $Zn^{2+}$  o  $Mg^{2+}$  dependiendo de la isoforma y que presentan secuencias de aminoácidos idénticos alrededor del sitio activo. Estas proteínas se encargan de remover grupos fosfato de



una amplia variedad de sustratos que incluyen nucleótidos, proteínas y alcaloides. Las fosfatasas alcalinas se encuentran a lo largo de todo el reino animal y se localizan primariamente en células del epitelio intestinal de los insectos, ancladas a la membrana mediante GPI. Al igual que las APNs, se ha propuesto que las ALPs de los insectos participan en la absorción de metabolitos derivados de la dieta así como procesos de transporte (Eguchi, 1995). Respecto a la caracterización de ALP como un receptor de toxinas Cry la información es menos abundante, sin embargo se tienen evidencias de que esta enzima es una proteína que juega un papel en el mecanismo de acción. En *M. sexta* se identificó mediante electroforesis de 2 dimensiones, seguida de un ensayo de unión a ligando una ALP de 65 kDa de peso como una proteína de unión a Cry1Ac (McNall & Adang, 2003). También se ha reportado que las fosfatasas alcalinas de dípteros poseen propiedades similares a las de lepidópteros. En *Aedes aegypti* se ha demostrado, mediante cromatografía de afinidad, que una ALP es capaz de unir a la toxina Cry11Aa y un fago-péptido que une a esta ALP fue capaz de bloquear la unión de la toxina Cry11Aa a ALP disminuyendo la toxicidad de esta  $\delta$ -endotoxina, lo cual sugiere un rol funcional en la susceptibilidad a las toxinas Cry (Fernandez et al., 2006). El silenciamiento de ALP mediante RNA de interferencia en *M. sexta* da lugar a un fenotipo de tolerancia a la toxina Cry1Ab (Flores-Escobar et al., 2013). En el lepidóptero *Heliothis virescens* una ALP de 68 kDa anclada por GPI une a la toxina Cry1Ac y se demostró que la expresión de esta proteína se encontraba reducida en una línea resistente, lo cual sugirió un rol funcional en el mecanismo de acción (Jurat-Fuentes et al., 2004). Además, se ha documentado que los niveles reducidos de expresión de una ALP asociada a membrana, son una característica común en poblaciones resistentes a toxinas Cry de *H. virescens*, *H. armígera* y *Spodoptera frugiperda* (Jurat-Fuentes et al., 2011).

## Cadherina

La superfamilia de cadherinas es altamente diversa y cumple una variedad de funciones que incluyen adhesión celular, migración, organización del citoesqueleto y morfogénesis, la expresión de cadherinas se encuentra altamente regulada espacial y temporalmente. Estas proteínas se caracterizan por la presencia de dominios repetidos de unión a calcio, también denominados repetidos de cadherina, los cuales están conformados por aproximadamente 110 aminoácidos de longitud. Las cadherinas poseen glicosilaciones y usualmente se encuentran ancladas a la membrana mediante un dominio transmembranal (Gumbiner, 1996). Generalmente las cadherinas clásicas se ubican en uniones adherentes, pero una característica interesante de una isoforma de cadherina de lepidópteros es que se encuentra en la membrana apical de las células del epitelio del intestino medio que es el sitio de acción de las toxinas Cry (Jiang Chen et al., 2005). La cadherina que une a las toxinas Cry se localiza en la membrana apical de las células columnares del intestino, aunque la función fisiológica exacta de esta cadherina es desconocida (Pigott & Ellar, 2007), se ha estudiado de manera extensa como receptor de proteínas Cry1A y la evidencia acumulada indica que juega un papel crucial en mediar la susceptibilidad a toxinas Cry (Pigott & Ellar, 2007). Una cadherina se aisló del epitelio del intestino medio del lepidóptero *M. sexta* en virtud de su alta afinidad de unión por la toxina Cry1Ab (Vadlamudi et al., 1993). Se ha demostrado que la unión de alta afinidad de las toxinas Cry1A a este receptor ocurre en una región adyacente al dominio extracelular próximo a la membrana (Dorsch et al., 2002). Las proteínas tipo cadherina también han sido descritas como receptores de las toxinas Cry4Ba y Cry11A en los dípteros *Anopheles gambiae* (Hua et al., 2008), *A. aegypti* (Jianwu Chen et al., 2009) y en el coleóptero *Tenebrio molitor* (Fabrick et al., 2009). A la fecha, se ha demostrado que todos los genes de cadherina que han sido clonados y expresados en cultivo celular, son capaces de unir a la toxina y de conferir susceptibilidad a ella. Estos ensayos de expresión heteróloga han proporcionado evidencia contundente del papel funcional de la cadherina de los lepidópteros *M. sexta* (Dorsch et al., 2002; Hua et al., 2004; Meng et al., 2001; Zhang et al., 2005), *B. mori* (Nagamatsu et al., 1999), *H. virescens* (Jurat-Fuentes & Adang, 2006) y *O. nubilalis*

(Flannagan et al., 2005) Por otra parte se ha reportado que un fragmento de cadherina, CR12 de *M. sexta* es capaz de mejorar la toxicidad de la toxina Cry1Ab, y esto correlaciona con la formación de oligómeros *in vitro* (Chen et al., 2007; Pacheco et al., 2009). El papel funcional de la cadherina también ha sido corroborado mediante la caracterización de poblaciones de insectos resistentes. En el caso de este receptor, se han descrito al menos tres plagas de lepidópteros que poseen mutaciones en el gen de cadherina, proteína a la cual se une la toxina Cry1Ac. En *H. virescens* la disrupción de un gen de CADR por la inserción de un retrotransposón, se encuentra asociada a altos niveles de resistencia a la toxina Cry1Ac (Gahan et al., 2001). Poblaciones de campo de la plaga *P. gossypiella*, poseen tres alelos mutantes de un gen que codifica para cadherina ligado a la resistencia a la toxina Cry1Ac. Cada uno de estos 3 alelos presenta deleciones que eliminan aminoácidos presentes en la región de unión con la toxina (Morin et al., 2003). En una población resistente a la toxina Cry1Ac de *H. armigera* se identificó un alelo de cadherina que presenta un codón de paro prematuro (Xu et al., 2005). Los resultados de estos estudios demostraron una fuerte asociación entre las mutaciones en alelos de cadherina y resistencia a la toxina Cry1Ac, sin embargo no se determinó el paso del mecanismo de acción que se encuentra afectado en las poblaciones resistentes cuando esta proteína está ausente.

## **Transportador ABCC2**

Reportes recientes en cinco especies distintas de insectos lepidópteros, revelaron un mecanismo genético de resistencia novedoso en el cual se liga la resistencia a mutaciones en el transportador ABCC2 (Atsumi et al., 2012; Baxter et al., 2011; Gahan et al., 2010). Los transportadores ABC conforman una superfamilia de proteínas de membrana que transportan una variedad de sustratos, exógenos y endógenos, en contra de su gradiente de concentración mediante la hidrólisis de ATP. El subconjunto de la subfamilia C de transportadores ABC que consiste de un solo polipeptido que comprende 12 hélices transmembranales, se conoce como el grupo de proteínas largas de resistencia a multidroga (MRPs). La estructura típica de un transportador ABC

(Figura 6) consiste de cuatro dominios: dos dominios que atraviesan la membrana (MSD1 y MSD2); cada uno conformado por seis hélices transmembranales (TMs), los cuales son seguidos de un dominio de unión a nucleótido (NBD-1 y NBD-2), donde ocurre la unión e hidrólisis de ATP que provee la energía para el transporte del sustrato (Aller et al., 2009; Chen & Tiwari, 2011). En mamíferos el transportador ABCC2 se expresa de manera predominante en órganos excretorios y barreras fisiológicas como las células epiteliales localizadas en hígado, riñón e intestino (Payen et al., 2002). Los transportadores ABCC2 se involucran en el transporte de iones y la secreción de toxinas, ya que tienen la capacidad de transportar diferentes sustratos entre los que se encuentran xenobióticos y metales pesados, además de que confieren resistencia a antibióticos y agente quimioterapéuticos (Dean et al., 2001). En el gusano de seda *B. mori* se han identificado 51 genes de transportadores ABC putativos, dentro de ellos 15 pertenecen a la subfamilia ABCC (Xie et al., 2012). En insectos los transportadores ABC poseen funciones que afectan el metabolismo, desarrollo y la resistencia a insecticidas químicos, interesadamente en los lepidópteros *B. mori* y *T. ni*, la expresión de los genes que codifican para transportadores ABCC se encuentra enriquecida en el intestino medio (Labbé et al., 2011).

El análisis de tres poblaciones resistentes a la toxina Cry1Ac de *H. virescens* reveló que una mutación por delección en el transportador ABCC2 confiere resistencia a la toxina Cry1Ac. De manera interesante al compararse esta mutante con una población de este lepidóptero resistente debido a mutaciones en cadherina, se determinó que la mutación en el transportador ABCC2 produce niveles más altos de resistencia a la toxina Cry1Ac que la mutaciones en cadherina (Gahan et al., 2010). En el caso de *P. xylostella*, la población resistente NO-QAGE presenta un delección de 30 pb en el exón 20 del gen *abcc2*, esta mutación resulta en una delección de 10 aminoácidos que elimina la hélice transmembranal 12 (Baxter, Badenes-Pérez, et al., 2011). En el gusano de seda *B. mori* la resistencia a las toxina Cry1Ab se encuentra ligada a una mutación en el gen del transportador ABCC2, resultando en la inserción de un residuo

de tirosina en el asa expuesta al espacio extracelular que une a las hélices transmembranales 3 y 4. En este estudio la resistencia fue revertida al introducir el alelo del gen ABCC2 silvestre en la línea resistente a través del sistema GAL4-UAS (Atsumi et al., 2012). Por otro lado en *S. exigua*, se reportó la delección de 246 nucleótidos del mensajero del gen ABCC2, lo cual resulta en la pérdida de 82 aminoácidos en uno de los dominios de unión a nucleótidos (NBD-2), esta mutación concede resistencia a la toxina Cry1Ca. Adicionalmente el silenciamiento del gen ABCC2 mediante RNA de interferencia en *S. exigua* conlleva una disminución en la susceptibilidad a la toxina Cry1Ca. (Youngjin Park et al., 2014)

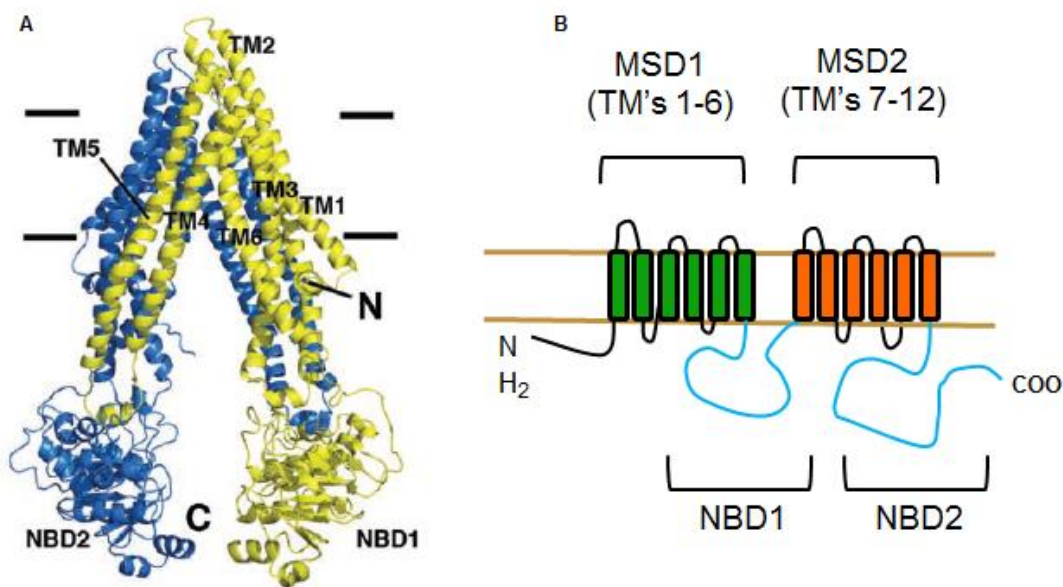


Figura 6. Estructura general de un transportador ABC representación A) cristalográfica (Aller et al., 2009) y B) esquemática. Se muestran los dominios que atraviesan la membrana (MSD's), cada uno conformado por 6 hélices transmembranales (TM's) y los dominios de unión a nucleótido (NBD's) donde ocurre la hidrólisis de ATP.

En *H. armigera*, una población resistente a la toxina Cry1Ac, posee un codón de paro prematuro en el gen ABCC2 (Xiao et al., 2014). También se ha involucrado a un transportador de la subfamilia ABCG en la resistencia de una población de *P. xylostella* a la toxina Cry1Ac. Al silenciar el gen ABCG (*Pxwhite*) en la población susceptible se

genera tolerancia a la toxina Cry1Ac (Guo et al., 2015). En otro estudio, se colectaron y analizaron tres líneas de *P. xylostella* que presentaron resistencia a la toxina Cry1Ac, denominadas DBM1Ac-R (Florida), SZ-R (Shenzhen) y SH-R (Shanghai), a partir de ellas se generó una cuarta línea casi isogénica denominada NIL-R que presenta alta resistencia a la toxina Cry1Ac, se encontró que en las líneas resistentes la expresión de fosfatasa alcalina (PxmALP) así como la expresión de dos transportadores ABC: ABCC2 y ABCC3 se encuentra disminuida en comparación con la línea sensible. Sin embargo esta disminución en la expresión no ocurre como consecuencia de mutaciones en los genes que codifican para estas proteínas, sino como consecuencia de la sobreexpresión de una MAP cinasa (MAP4K4), que se localiza en cercanía a los genes PxABCC. Al silenciar el gen MAP4K4 en la línea resistente NIL-R se observó un aumento en los niveles de expresión de PxmALP, PxABCC2 y PxABCC3, lo cual conlleva la recuperación de la sensibilidad a la toxina Cry1Ac (Z. Guo, Kang, Chen, et al., 2015).

Mediante microscopía de fluorescencia e inmunoprecipitación acoplada a cromatografía líquida y espectrometría de masas, se ha demostrado que el transportador ABCC2 es una proteína de unión a las toxinas Cry (Tanaka et al., 2013; Zhou et al., 2016), y la evidencia sugiere que esta molécula de membrana juega un papel importante en el proceso de intoxicación. Estudios de expresión heteróloga del transportador ABCC2 de *B. mori* en la línea celular Sf9 confiere sensibilidad a las toxinas Cry1As sugiriendo que esta molécula es un receptor funcional (Tanaka et al., 2013). Así mismo en estudios de “voltage clamp”, se demostró que la expresión del transportador ABCC2 de *Bombyx mori* en ovocitos de *Xenopus* induce la formación de poros estables de la toxina Cry1Aa con mayor eficiencia que el receptor cadherina o la aminopeptidasa de este lepidóptero (Tanaka et al., 2016). En conjunto, estos reportes muestran que el transportador ABCC2 tiene un papel preponderante en el proceso de intoxicación en distintas especies de lepidópteros, y que diferentes interacciones toxina-receptor pueden ocurrir en distintas especies de insectos, sin embargo la función del transportador en el modo de acción de las toxinas Cry aún no se ha determinado.

## **Toxinas Cry1A Modificadas (Cry1AMod), una estrategia para contrarrestar el desarrollo de resistencia**

La aparición de resistencia en insectos plaga, pone en riesgo el empleo biotecnológico de las toxinas Cry en el campo. En un intento de contrarrestar la resistencia a las toxinas Cry asociada a mutaciones en el receptor cadherina, se diseñaron toxinas modificadas (Cry1AMod) a las cuales se les removió la hélice  $\alpha$ -1 mediante ingeniería genética. Estas toxinas no requieren del paso de interacción con cadherina para promover la oligomerización. Las toxinas modificadas son capaces de matar insectos que poseen mutaciones en los genes que codifican para cadherina, además presentan actividad contra larvas de *M. sexta* en las cuales el gen de cadherina fue silenciado (Soberón et al., 2007). Inicialmente se había propuesto que las toxinas Cry1AMod sólo serían efectivas si la resistencia se encontraba ligada a genes que codifican al receptor putativo cadherina. No obstante, se ha demostrado que estas toxinas también son capaces de matar insectos cuyas bases genéticas de resistencia no están relacionadas a mutaciones en el gen de cadherina, siendo activas contra insectos cuya resistencia está ligada a mutaciones en el transportador ABCC2. Al probar la toxina Cry1AcMod en contra de la líneas resistente NO-QAGE de *P. xylostella* cuya resistencia se asocia a una mutación en el transportador ABCC2, se observó que la proporción de resistencia (calculada dividiendo la  $LC_{50}$  de la población resistente entre la  $LC_{50}$  de la población susceptible) disminuyó de >110,000 (para la toxina silvestre) a 4.8 (toxina Cry1AcMod). En el caso de *Trishoplusia ni* disminuyó de >1000 (Cry1Ac silvestre) a 8 (Cry1AcMod) ( Tabashnik et al., 2011). La oligomerización de las toxinas Cry es un paso limitante en el mecanismo de acción, en consecuencia una toxina capaz de formar oligómeros en ausencia de receptor y que es capaz de superar la resistencia en poblaciones afectadas en el transportador ABCC2, sugiere que el transportador ABCC2 podría estar funcionando como una molécula de unión que promueve la oligomerización de las toxinas Cry. Sin embargo se ha propuesto que el transportador ABCC2 facilita la inserción del oligómero de toxinas Cry1A en la membrana (Heckel, 2012).

**Hipótesis:** El transportador ABCC2 y la cadherina cumplen una función similar promoviendo la oligomerización de la toxina Cry1Ac en *P. xylostella* y *P. gossypiella* respectivamente.

**Objetivo general:** Determinar si el transportador ABCC2 y el receptor cadherina son necesarios para la oligomerización eficiente de la toxina Cry1Ac en los lepidópteros *P. xylostella* y *P. gossypiella* respectivamente.

**Objetivos particulares:**

Analizar la unión de las toxinas Cry1Ac y Cry1Ac Mod a vesículas de la microvellosidad media apical (VMMA) de poblaciones susceptibles y resistentes de *P. xylostella* (NO-QAGE, mutante en ABCC2) y *P. gossypiella* (AZPR, mutante en caderina).

Evaluar la oligomerización de la toxina activada Cry1Ac en vesículas de la microvellosidad media apical de poblaciones susceptibles y resistentes de *P. xylostella* (NOQAGE, mutante en ABCC2) y *P. gossypiella* (AZPR, mutante en cadherina)

Analizar la asociación de oligómeros pre-formados en vesículas de la microvellosidad media apical de poblaciones susceptibles y resistentes de *P. xylostella* (NOQAGE, mutante en ABCC2)



## Materiales y Métodos

**Tabla I. Soluciones**

Soluciones				
Nombre	Composición		Comentarios	
Cloruro de Calcio	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10 mM	Esterilizar	
Solución I Medio HCT	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68 g / L	Esterilizar	
Solución II Medio HCT	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	12.3 g/L	Esterilizar	
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.169 g/L		
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.4 g/L		
Solución III Medio HCT	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2 g/L	Esterilizar	
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100 ml/L		
Solución IV Medio HCT	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	14.7 g/L	Esterilizar	
Amortiguador de Laemli 4x	Tris HCL	1,5 M	5 mL / 10	Disolver y mantener a 4°C
	pH	6.8	mL	
	Glicerol		4 mL / 10 mL	
	SDS			
	Azul de Bomofenol		0.4g / 10mL	

	$\beta$ - Mercaptoetanol	0.1%		
		1mL	/10	
		mL		
Amortiguador de Corrida 10X	Tris	30	g/L	
	Glicina	14.4g/L		Filtrar
	SDS al 10%	10 mL/L		
Amortiguador de Transferencia	Tris	30	g/L	
	Glicina	14.4g/L		Filtrar
	Metanol	200mL/L		
Amortiguador de Carbonatos 5X	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	5.5	g/100 mL	Las soluciones se preparan por separado. Se toman 20 ml de la solución de $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ y se le agregan aproximadamente 80 ml de la solución de $\text{Na}_2\text{CO}_3$ hasta llegar a un pH de 10.5
	$\text{NaHCO}_3$	4.2g/100	mL	
Amortiguador de Disección s/inhibidores	Manitol	300	mM	Ajustar el pH a 7.4 con KOH
	Tris	17	mM	
	DTT	2	mM	
	$\text{CaCl}_2$	1mM		

Amortiguador de Unión	BSA Tween en PBS 1X	20	0.1% 0.1%,	Filtrar
-----------------------	---------------------------	----	---------------	---------

Solución de preparación VMMA s/inhibidores	de Manitol de Tris DTT CaCl <sub>2</sub>	300 17 2 1	mM mM mM mM	Ajustar el pH a 7.4 con KOH
--	---	---------------------	----------------------	-----------------------------

Solución Lavado Cristales	de NaCl de EDTA,	0.5 0.01	M M	Ajustar el pH a 8.0
---------------------------	---------------------	-------------	--------	---------------------

Amortiguador TTN	Tris Tritón X-100 NaCl	20 0.01% 300	mM mM mM	Almacenar a 4°C.
------------------	------------------------------	--------------------	----------------	------------------

**Tabla II. Medios de cultivo**

Medios para Bacterias			
Nombre	Composición		Comentarios
LB	Bacto Triptona	10 g/L	Ajustar el pH a 7 con NaOH y esterilizar.
	Extracto de levadura	5 g/L	
	NaCl	10 g/L	
LB agar	Medio LB pH 7.0	1L	Esterilizar. Dejar enfriar hasta ~50°C y añadir, si procede, el antibiótico de selección. Distribuir en cajas petri y dejar solidificar. Conservar a 4°C
	Agar	15 g	
HCT	Bacto Triptona	5 g/L	Ajustar el pH a 7.25 con KOH y esterilizar. Antes de usar complementar con 50 ml de la Sol I, 1 ml de la Sol II, 10 ml de la Sol III, 10 ml de la Sol IV y 30 ml de Glucosa al 10% por cada litro.
	Casa-amino-acidos	2 g/L	

## Cepas bacterianas

*B. thuringiensis* st. HD73: Cepa que expresa de forma natural la protoxina Cry1Ac silvestre. No posee resistencia a antibiótico.

*B. thuringiensis* st.407 Cy1Ac Mod: Cepa portadora del plásmido pHT315-1AcMod que expresa la protoxina Cry1AcMod, ingenierada para carecer de la hélice  $\alpha$ -1 del dominio I, posee resistencia a eritromicina (Soberón et al., 2007).

*Escherichia coli* BL21 CR7-CR12: Cepa que contiene el fragmento CR7-CR12 del receptor cadherina que comprende los aminoácidos 810-1480, clonados en el vector de expresión pET22b+ inducible por IPTG.

## Poblaciones de insectos

*P. gossypiella* APHIS-S: es una población susceptible que se ha mantenido en laboratorio por más de 30 años sin exposición a toxinas Cry de Bt (Liu et al., 2001).

*P. gossypiella* AZPR: es una población resistente a la toxina Cry1Ac establecida a partir individuos sobrevivientes a un bioensayo diagnóstico con la toxina Cry1Ac, estos individuos provienen de 10 poblaciones colectadas en campos de algodón de Arizona en el año 1997 (Tabashnik et al., 2000). La resistencia de esta población a la toxina Cry1Ac se encuentra asociada a mutaciones en el gen de cadherina (Morin et al., 2003). El tejido intestinal de ambas poblaciones de *P. gossypiella* fue amablemente proporcionado por el Dr. Bruce Tabashnik y el Dr. Gopalan C. Unnithan, del Departamento de Entomología de la Universidad de Arizona.

*P. xylostella* Geneva 88: es una población susceptible a la toxina Cry1Ac que se comenzó a criar en 1988 a partir de la colección de larvas en un campo de col cercano a Geneva en el estado de Nueva York (Shelton et al., 1993).

*P. xylostella* NO-QAGE: es una población resistente a la toxina Cry1Ac que se

estableció a partir de la cruce de la población resistente seleccionada en campo NO-QA aislada en Hawaii, con la población susceptible Geneva 88, seguida de selección de la progenie F3 en presencia de la toxina Cry1Ac (Tabashnik et al., 2000). La resistencia de la población NO-QAGE a la toxina Cry1Ac se encuentra ligada a mutaciones en el transportador ABCC2 (Baxter et al., 2011). Ambas poblaciones de *P. xylostella* fueron adquiridas de Benzon Research Inc. ([www.benzonresearch.com](http://www.benzonresearch.com)).

## **Disección de larvas**

Se disectaron larvas del tercer estadio de desarrollo de *P. gossypiella* y en el caso de *P. xylostella* se usaron larvas del cuarto estadio de desarrollo. El estadio de desarrollo se seleccionó con base en el tamaño mínimo que deben tener los insectos para poder ser manipuladas en la disección para extraer el intestino medio, además de ser estadios en los cuales la larva aún presenta susceptibilidad a las toxinas Cry. Las larvas se mantuvieron en hielo durante una hora previa a la disección. Primeramente se fijaron los extremos de la larva a una base de disección, se realizó un corte longitudinal para exponer el intestino, la porción media fue extraída cuidadosamente, se eliminó el bolo alimenticio y la membrana peritrófica. El tejido se lavó exhaustivamente en amortiguador de disección y se congeló inmediatamente a  $-70^{\circ}\text{C}$  para ser almacenado hasta su uso.

## **Purificación de VMMA**

Las vesículas de la microvellosidad media apical (VMMA) de las cuatro poblaciones de insectos analizadas se purificaron mediante precipitación diferencial con  $\text{MgCl}_2$ . El tejido intestinal se diluyó en una relación 1:10 peso/volumen en la solución de preparación de VMMA. El tejido se colocó en un homogenizador de vidrio y se dieron 9 golpes con un émbolo estéril a 2,250 rpm. Una vez que el tejido fue homogenizado, se adicionó de manera suave un volumen de  $\text{MgCl}_2$  24 mM, la solución se mezcló suavemente y se incubó durante 15 minutos en hielo. Una vez finalizada la incubación, la muestra se centrifugó a 4,500 rpm durante 15 minutos a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  en

un rotor Beckman JA-20, el sobrenadante obtenido de esta centrifugación fue recuperado y se centrifugó a 16,000 rpm durante 30 minutos a 4°C en el mismo rotor. La pastilla obtenida fue resuspendida en medio volumen de solución de preparación de VMMA y medio volumen de MgCl<sub>2</sub> 24 mM. Los pasos de centrifugación previamente descritos fueron repetidos una vez más y la pastilla obtenida se resuspendió en solución de preparación de VMMA diluida con CaCl<sub>2</sub> 10 mM en una proporción 1:1. Finalmente, se determinó concentración de proteínas de membrana de las VMMA mediante el método de Lowry, se alicuotaron y se almacenaron a -70°C.

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

Las cepas que expresan las toxinas Cry1Ac silvestre y Cry1AcMod, fueron sembradas en medio sólido LB; adicionado con eritromicina (10 µg/mL) en el caso de la cepa 407 Cry1AcMod, y se crecieron durante 12 horas a 30°C. A partir de estas cajas se sembraron 10 cajas más de medio de esporulación HCT-Agar (ver tabla 2) complementado con antibiótico de selección eritromicina (10 µg/mL) en el caso de Cry1AcMod. El crecimiento de estos cultivos se realizó en una incubadora a 30°C durante 72 horas, tiempo aproximado en el cual se completa la esporulación. Una vez que se pudieron observar al microscopio los cristales, la totalidad de la biomasa fue recuperada de las cajas y se colocaron en tubos estériles conteniendo solución de lavado. La pastilla fue lavada 3 veces con esta solución, centrifugando 10,000 rpm durante 15 minutos entre cada lavado. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla se lavó 3 veces más con una solución de PMSF 1 mM, centrifugando a 10,000 rpm durante 15 minutos para finalmente recuperar la muestra de espora-cristal.

Los cristales se purificaron utilizando un gradiente discontinuo de soluciones de sacarosa de 84%, 79%, 72% y 67% cada una de ellas complementada con 2 mL de Tris-HCl 1 M pH 8, 80 µL de NaCl 5 M y 400 µL de Tritón X-100 al 1%. Las soluciones de mayor concentración se colocaron en el fondo del tubo y por último la muestra de esporas-cristales previamente resuspendida en amortiguador TTN y sonicada con 5

pulsos de 50 segundos a 20 watts, con un minuto de descanso entre pulsos. Los gradientes fueron centrifugados a 23, 000 rpm a una temperatura de 15°C durante 30 minutos en una ultracentrifuga L-80 (Beckman). Las fracciones resultantes fueron colectadas, observadas al microscopio y aquellas en las que se detectó la presencia de los cristales fueron lavadas tres veces con agua Mili-Q más PMSF 1 mM, esto con la finalidad de eliminar el exceso de sacarosa. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos entre cada lavado. Finalmente los cristales purificados fueron resuspendidos en 3 mL de PMSF 1 mM y se almacenaron a 4°C.

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

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

El procesamiento proteolítico se realiza *in vitro*; primeramente se ajusta el pH a 8.5 mediante la adición de  $\frac{1}{4}$  parte del volumen en el cual se encuentran las protoxinas de Tris-HCl 1M pH 8, se añadió tripsina (Sigma-Aldrich) en una relación 1:20 (m/m) a las protoxinas; la reacción fue incubada a 37°C durante una hora. Posteriormente la reacción se detuvo al adicionar el inhibidor de proteasas PMSF a una concentración final de 1 mM. Posterior a la digestión, las muestras se centrifugaron a 90,000 rpm en una ultracentrífuga de mesa Optima Max® (Beckman Coulter) para eliminar productos de precipitación de la digestión, Finalmente los sobrenadantes que contienen a la



toxina activa fueron recuperados, y almacenados a 4°C hasta su uso. El procesamiento de las proteínas se visualizó en geles de acrilamida al 10%, los cuales fueron teñidos con azul de Coomasie.

### **Purificación de toxinas activadas por intercambio iónico**

Las toxinas activadas Cry1Ac silvestre y Cry1Ac Mod fueron purificadas por cromatografía de intercambio iónico empleando una columna Mono Q Sepharose fast flow (GE Healthcare) acoplada a un sistema de FPLC AKTA (Amersham Biosciencias) utilizando un amortiguador 50 mM Tris-HCl, 50mM NaCl y un gradiente lineal de NaCl de 50 mM a 500 mM. Las concentraciones de proteína se determinaron mediante el método de Bradford usando albumina de suero bovino como estándar.

### **Cuantificación de proteínas**

Método de Lowry: Se preparó una mezcla de 1 mL de solución A a la cual se le añadieron 20 µL de la solución S del sistema DC Protein-dye (BioRad). Se tomaron 5 µL de muestra y se agregaron 125 µL de la mezcla preparada previamente, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, una vez transcurrido este período, se adicionó 1 mL de la solución B y se incubó durante 15 minutos adicionales. La absorbancia de las muestras fue medida a 750 nm y los valores obtenidos se interpolaron en una curva estándar de BSA.

Método de Bradford: Se tomaron 10 µL de muestra problema y se aforó con agua a un volumen final de 800 µL, posteriormente se agregaron 200 µL de reactivo de Bradford 5X (BioRad) y la mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La

cuantificación de proteína se realizó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm, la absorbancia registrada se interpoló en una curva estándar de BSA.

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

Se tomó una concentración conocida de toxina soluble y fue mezclada con éster de biotina (Amersham) en una relación 0.5 mg de proteína/20  $\mu$ L de reactivo. La mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. El éster de biotina reacciona con los residuos de lisina y con el N-terminal de la proteína. Para separar la toxina marcada de la biotina libre se utilizaron columnas con 1 ml de Sephadex G25 (Sigma) en PBS 1X, las cuales se lavaron con aproximadamente 20 ml de PBS 1X y fueron centrifugadas por 2 minutos a 2,000 rpm para eliminar el exceso de PBS. Se colocaron 400  $\mu$ L de la toxina incubada en la columna, y se centrifugó durante 2 minutos a 2,000 rpm para separar la toxina marcada de la biotina libre.

### **Detección de toxinas biotiniladas**

Las toxinas marcadas se corrieron en un gel de acrilamida desnaturizante al 10%. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (ECL-Amersham Pharmacia Biotech) por una hora a 350 mA. Se verificó la correcta transferencia mediante la tinción de la membrana con rojo de Ponceau 0.5% en ácido acético 2%. El exceso de colorante fue eliminado con agua destilada y la membrana se incubó en PBS 1X durante 10 minutos, seguida de una incubación en PBS 1X Tween 20 al 2% durante 20 minutos, posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS 1X Tween 20 al 0.1% de 15 minutos cada uno, después, la membrana se incubó con estreptavidina acoplada a peroxidasa (Amersham Life sciences) 1:30,000 v/v en PBS 1X Tween-20 0.1% durante una hora, transcurrido el periodo de incubación, la membrana fue lavada dos veces con PBS 1X Tween 20 al 0.1% durante 10 minutos y dos veces más con PBS 1X durante 5 minutos. Una vez que se eliminó el exceso de estreptavidina con los lavados, la membrana fue incubada con el reactivo Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

durante un minuto y la colección de imágenes se realizó en el visualizador de quimioluminiscencia Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences).

### **Ensayo de unión de toxinas a VMMA**

Se incubaron 10 µg de VMMA's de *P. gossypiella* o *P. xylostella*; según sea el caso, con 5 nM de la toxina Cry1Ac silvestre o la toxina Cry1Ac Mod marcadas con biotina en un volumen final de 100 µL de amortiguador de unión. La mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente al término de la cual se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 10 minutos. Se realizaron dos lavados con 100 µL de amortiguador de unión, la pastilla fue resuspendida en 15 µL de PBS más mezcla lítica 1X y se separaron las proteínas en un gel desnaturalizante al 10% para ser transferidas a la membrana de nitrocelulosa. Después de la transferencia se procedió de la misma forma descrita previamente.

### **Ensayos de competencia homóloga**

Se realizaron ensayos de unión de las toxinas Cry1Ac silvestre o Cry1AcMod a VMMA de *P. gossypiella* o *P. xylostella*; según sea el caso, en presencia un exceso molar de 1000 veces de la misma toxina sin marca, las muestras se procesaron como se describió en la sección anterior.

### **Western Blot Anti-Cadherina**

Para la detección del receptor cadherina se utilizó un anticuerpo que fue generado contra un fragmento de cadherina de *P. gossypiella*, el anticuerpo 229 reconoce el fragmento que comprende los repetidos 8-9 (CR8-CR9) (Morin et al., 2003). En el caso de *P. xylostella* se utilizó un anticuerpo policlonal que fue generado contra la cadherina de *M. sexta*, pero que presente reactividad cruzada en contra de la cadherina de *P. xylostella*. Se procesaron muestras de 10 µg de VMMA de cada insecto, las muestras

se hirvieron durante 3 minutos en buffer de Laemli 4X, posteriormente se resolvieron en un SDS-PAGE al 10% y se electrotransfirieron a una membrana PVDF. La membrana se bloqueó con leche descremada al 5%, después del bloqueo la membrana se lavó 3 veces con PBS 1X Tween 20 al 0.1% durante 7 minutos, la cadherina se detectó incubando la membrana con los anticuerpos previamente descritos usando una dilución 1:30,000 v/v durante 1h. La membrana se lavó 3 veces más y se incubó con un anticuerpo anti-conejo generado en cabra acoplado a peroxidasa de rábano picante (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) usando una dilución 1:10,000. Finalmente la visualización se realizó con el reactivo Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y las imágenes fueron colectadas en el visualizador de quimioluminiscencia Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences).

### **Expresión del fragmento de cadherina CR7-CR12**

Se preparó un pre-cultivo de la cepa de *E. coli* BL21 CR7-CR12 en medio LB complementado con ampicilina a una concentración de 100 µg / mL, el cual fue incubado a 37°C con agitación a 250 rpm durante 12 horas. Se tomó un volumen 500 µL de pre-cultivo con el cual se inocularon 500 mL de medio 2XTY líquido con ampicilina (100 µg / mL), este cultivo se incubó bajo las mismas condiciones previamente descritas hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de 0.7. Una vez alcanzada esta D.O., se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM, posteriormente el cultivo se incubó durante 5 horas adicionales a 30°C con agitación a 250 rpm. La biomasa se recuperó centrifugando a 5,000 rpm durante 15 minutos. Para la purificación, la pastilla fue resuspendida en solución B (urea 8M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM y Tris base 10 mM), y se dieron 3 pulsos de 1 minuto a máxima amplitud con el sonicador Ultrasonic Processor VCX 130PB, con 30 segundos de descanso entre pulsos. Después, la muestra fue centrifugada a 60,000 rpm durante 25 minutos, el sobrenadante que contiene el fragmento CR7-CR12 soluble fue recuperado y se almacenó a 4°C. Para la purificación, se empaquetó una columna con 2 mL de resina níquel-agarosa (QIAGEN) y fue equilibrada con PBS 1X, se adicionaron 5 mL del lisado previamente obtenido y se

pasaron a través de la resina mediante una bomba peristáltica (GE Healthcare). La columna se lavó con 15 mL de imidazol 10 mM, posteriormente con 5 mL de imidazol 30 mM. La proteína se eluyó en fracciones de 1 mL con 5 mL de imidazol 250 mM y 5 mL de imidazol 500 mM. Finalmente las fracciones que contienen el fragmento CR7-CR12 fueron analizadas en SDS-PAGE, las fracciones de mayor pureza se concentraron mediante centrifugación en filtros amicon (Millipore) de corte 30 kDa, y fueron cuantificadas mediante el método de Bradford.

### **Ensayos de Oligomerización**

Los ensayos de oligomerización se realizaron usando dos cantidades distintas de las toxinas Cry1Ac silvestre y Cry1AcMod (0.5 µg y 1.5 µg), las cuales fueron incubadas en presencia de 15 µg de VMMA de cada una de las poblaciones susceptibles y resistentes de *P. gossypiella* y *P. xylostella*.

### **Formación de oligómeros**

Se incubó la toxina Cry1Ac silvestre en presencia de las VMMA de las poblaciones susceptibles y resistentes de *P. gossypiella* y *Plutella xylostella*, en un volumen total de 50 µL de amortiguador de carbonatos 50 mM a pH10.5, durante una hora a 37°C. Transcurrido este tiempo se agregó amortiguador de Laemli 4X a las muestras y se calentaron a 50°C durante 3 minutos. El volumen total de las muestras se resolvió mediante SDS-PAGE al 8%, posteriormente fueron electrotransferidas a una membrana PVDF y reveladas mediante western blot. Se utilizó un anticuerpo anti-Cry1Ac en una dilución 1:30,000 V/V como anticuerpo primario, para la visualización se empleó un anticuerpo anti-conejo generado en cabra acoplado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) usando una dilución 1:20,000 v/v. Finalmente el revelado se realizó con el reactivo Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology,

Inc.) y las imágenes fueron colectadas en el visualizador de quimioluminiscencia Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences).

### **Inserción de oligómeros**

El ensayo se realizó de manera similar incubando a las toxinas Cry1Ac y Cry1AcMod en presencia de las VMMA de los dos insectos, como se explicó en la sección anterior, con la diferencia de que las muestras fueron centrifugadas para separar la fracción membranal del sobrenadante, de esta manera solo se recupera la toxina que ha logrado asociarse a la membrana, las pastillas recuperadas fueron resuspendidas en 25  $\mu$ L de buffer carbonatos y se procedió con el análisis mediante western blot como se describió previamente.

### **Asociación de oligómeros preformados en solución a VMMA**

Para la formación de oligómeros en solución, se tomó 1  $\mu$ g de la toxina Cry1Ac silvestre y se mezcló mediante pipeteo con el fragmento de cadherina CR7-CR12, en una proporción 1:4 (toxina:fragmento) aforando a un volumen de 40  $\mu$ l con amortiguador de carbonatos 50 mM a pH 10.5 (Gómez et al., 2014). La mezcla se incubó durante 2 horas a 37°C, transcurrido este tiempo, se agregaron VMMA de la población susceptible o resistente de *P. xylostella* para obtener un volumen final de 50  $\mu$ L, así mismo se prepararon muestras de esta mezcla que fueron diluidas dos (volumen final 100  $\mu$ l) y cinco veces (volumen final 250  $\mu$ l) con buffer de carbonatos. Se incubó durante 1 hora más para permitir la asociación de oligómeros preformados con las membranas. Las pastillas se recuperaron mediante centrifugación y se analizaron mediante western blot como se describió previamente.

## **Aislamiento de RNA total de larvas de *P. xylostella***

Se disectó el tejido intestinal de 20 individuos de la población susceptible Geneva 88 y de 20 individuos de la población resistente NO-QAGE. El tejido obtenido se colocó en la solución estabilizadora de RNA: RNAlater (QIAGEN), este tejido se utilizó inmediatamente o se congeló a -70°C hasta su uso. El tejido se disgregó con el homogenizador de tejidos suaves CORDLESS PELLET PESTLE (Kimble Chase Life Science and Research). Posteriormente se procedió al aislamiento de RNA total con el paquete comercial RNeasy (QIAGEN) de acuerdo al protocolo proporcionado por el fabricante. El RNA total obtenido fue cuantificado en un Nanodrop 2000 (ThermoScientific).

## **Síntesis de DNAc y PCR para comprobar la mutación en el transportador ABCC2 de *P. xylostella***

Para la síntesis de DNAc se utilizó un oligo dT que permite la síntesis de la cadena complementaria de todos los RNAm presentes en la muestra de RNA total, esta síntesis se realizó con el sistema Super Script III Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Para verificar la presencia de la mutación deletoria de 30 bp en el DNAc NO-QAGE, se diseñaron oligonucleótidos específicos que amplifican un fragmento de 157 pb de cubre la región del exón 20 donde ocurre la deleción, el diseño se realizó con base en las secuencias de los mensajeros del gen ABCC2silvestre y mutante con números de acceso: JN030490 y JN030491 respectivamente (Figura7). Los productos obtenidos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

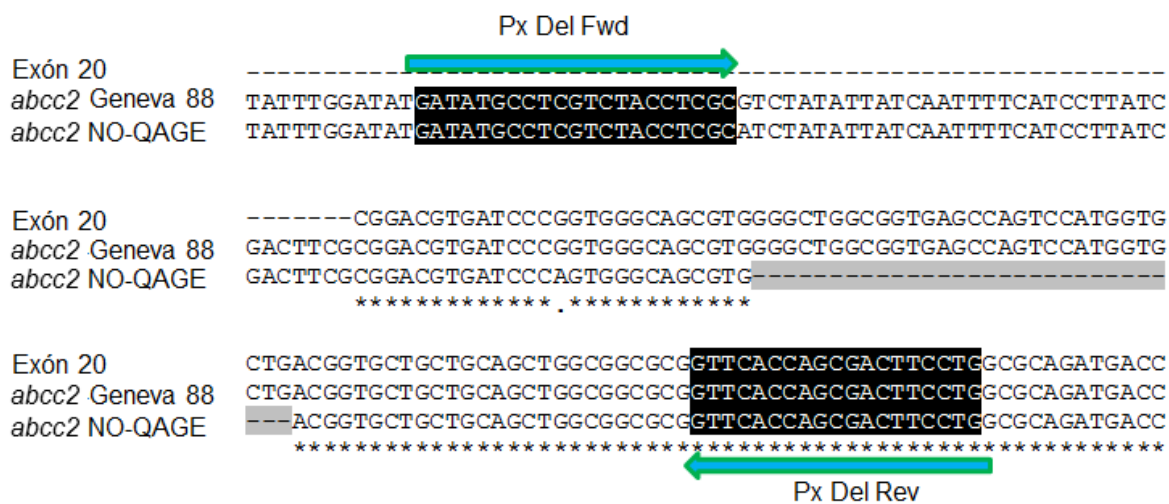


Figura 7. Región amplificada por los oligonucleótidos Px Del Fwd y Px Del Rev, se amplifica un fragmento de 157 pb que cubre parte del exón 20 donde se localiza la deleción en la población resistente NO- QAGE (resaltada en gris), las secuencias donde alinean los oligonucleótidos se resaltan en negro.

**Tabla III. Oligonucleótidos**

Oligonucleótido	Longitud	Secuencia
Px Del Fwd	21 nt	5'-gat atg cct cgt cta cct cgc-3'
Px Del Rev	19 nt	5'-cag gaa gtc gct ggt gaa c-3'



**Tabla IV. Condiciones de la PCR**

No. De Ciclos	Temperatura (C*)	Tiempo
1	95	5 min
30	95	30 s
	60	30 s
	72	30 s
1	72	10 min

### **Secuenciación de DNA**

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

## Resultados

De las moléculas de membrana descritas como receptores de toxinas Cry, la cadherina y el transportador ABCC2 resultan de particular interés, ya que se ha reportado que en los lepidópteros *P. gossypiella* y *P. xylostella* la aparición de altos niveles de resistencia a toxinas Cry en el campo se encuentra asociada a mutaciones en ambos genes de estas proteínas (Baxter et al., 2011; Morin et al., 2003). A pesar de que el papel de la cadherina en el proceso de intoxicación con toxina Cry1Ab se ha establecido en *M. sexta* (Gómez et al., 2002; Gómez et al., 2014), no se ha corroborado que la oligomerización sea el paso del mecanismo de acción que se encuentra afectado en la población de campo resistente a la toxina Cry1Ac de *P. gossypiella* que posee mutaciones en cadherina. Por otra parte en el caso del transportador ABCC2, los reportes de resistencia sugieren que juega un papel importante en la intoxicación mediada por toxinas Cry en diferentes especies de lepidópteros y particularmente con la toxina Cry1Ac en *P. xylostella*. Se ha propuesto que esta proteína transmembranal une al oligómero para facilitar su inserción en la membrana plasmática (Heckel, 2012), sin embargo el papel de esta molécula en el mecanismo de acción permanece sin determinar. Interesantemente las toxinas CryMod que superan la resistencia asociada a mutaciones en cadherina debido a que no requieren de la interacción con este receptor para oligomerizar, también son capaces de superar la resistencia asociada a mutaciones en el transportador ABCC2 en *P. xylostella* (Tabashnik et al., 2011), esto sugiere que posiblemente el transportador ABCC2 cumple con una función parecida a la cadherina.

Con el fin de determinar el papel del transportador ABCC2 es similar al de la cadherina en el mecanismo de acción, realizamos un análisis comparativo de unión, oligomerización y capacidad de inserción de la toxina Cry1Ac en los lepidópteros: *P. gossypiella* y *P. xylostella* que poseen mutaciones en cadherina y mutaciones en el transportador ABCC2, respectivamente. En la tabla V se resumen las poblaciones de insectos empleadas en este estudio.

**Tabla V. Poblaciones de insectos**

<i>P. gossypiella</i>		
Línea	.Resistencia a la toxina Cry1Ac	Mutaciones en cadherina
APHIS-S	NO	NO
AZP-R	>3,100 veces <sup>a</sup>	Codón de paro prematuro <sup>a</sup>
<i>P. xylostella</i>		
Línea	Resistencia a la toxina Cry1Ac	Mutaciones en abcc2
Geneva 88	NO	NO
NO-QAGE	>20,000 veces <sup>b</sup>	Delección de 30 pb en el exón 20 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Morin et al., 2003; <sup>b</sup>Tabashnik et al., 2000 ; <sup>c</sup>Baxter, et al., 2011

**Detección del receptor cadherina en poblaciones resistentes de *P. gossypiella* y *P. xylostella***

Para confirmar la presencia de la mutación deletoria en el receptor cadherina de *P. gossypiella* reportada por Morin y colaboradores (2003), evaluamos la expresión de esta proteína en las líneas APHIS-S y AZPR mediante ensayos tipo western blot. Utilizamos un anticuerpo que reconoce una región del receptor cadherina que comprende los repetidos CR8-CR9. En la línea APHIS-S detectamos una banda de 210 kDa (Figura 8A, carril 1) que corresponde a cadherina mientras que en la línea resistente AZPR no se observa esta banda (Figura 8A, carrile 2), únicamente se observan bandas de un peso menor o igual a 70 kDa, las cuales podrían corresponder a la forma truncas de la proteína y/o productos de degradación de las mismas. Por otra parte, también verificamos la expresión de cadherina en las líneas Geneva 88 y NO-QAGE de *P. xylostella*, para descartar alteraciones en este receptor de toxinas Cry que

podrían tener efecto sobre la unión u oligomerización. Como se observa en la Figura 8B en los carriles 1 y 2, se logró detectar una banda de 210 kDa en ambas líneas de este insecto, la cual coincide con el peso esperado para receptor cadherina. Esta observación concuerda con la literatura, ya que no existen reportes de mutaciones en el receptor cadherina de la línea NO-QAGE de *P. xylostella* (Baxter, Badenes-Pérez, et al., 2011), contrario a lo que sucede en *P. gossypiella* (Morin et al., 2003).

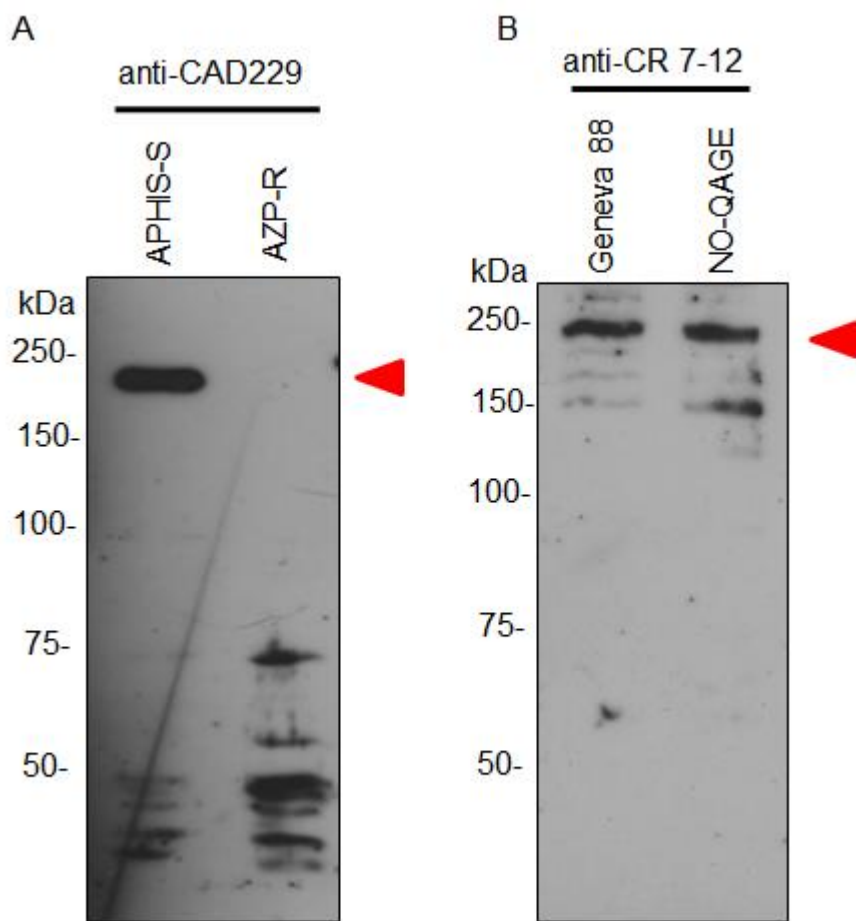


Figura 8. Western blot anti-cadherina en VMMA de A) Línea susceptible APHS-S y resistente AZPR de *P. gossypiella*, se observa la banda de 210 kDa correspondiente a cadherina en la línea susceptible, en la línea resistente se observan bandas iguales o menores a 70 kDa. B) Línea susceptible Geneva 88 y resistente NO-QAGE de *P. xylostella*, en este caso se observa la banda de 210 kDa correspondiente al receptor cadherina en ambas líneas. La banda correspondiente a cadherina se indica con la cabeza de flecha roja.

## **Confirmación del alelo mutante ABCC2 en la línea resistente NO-QAGE de *P.xylostella***

Confirmamos la presencia de la delección de 30 pares de bases (pb) en el gen ABCC2 de la línea resistente NO-QAGE de *P. xylostella* amplificando una región de 157 pb que contiene el sitio donde ocurre la mutación. La amplificación se realizó a partir de cDNA obtenido de muestras de RNA total de la línea susceptible Geneva 88 y la línea resistente NO-QAGE, como se detalló en materiales y métodos. El producto de PCR obtenido a partir del cDNA de la línea Geneva 88 presenta el tamaño esperado de 157 pb. En el caso de cDNA de la línea NO-QAGE observamos un producto de menor tamaño que concuerda con la delección de 30 pb (Figura 9B). Este resultado fue confirmado a través de la secuenciación de ambos productos de PCR (Figura 9C). Las secuencias obtenidas fueron alineadas con las secuencias previamente reportadas por Baxter y colaboradores (2011), con números de acceso JN030490 y JN030491 correspondientes a los RNAs mensajeros del gen ABCC2 de la línea Geneva 88 y la línea NO-QAGE respectivamente. El alineamiento de estas secuencias reveló la delección de 30 pb en el exón 20 del gen ABCC2 presente únicamente en la población NO-QAGE de *P. xylostella*. El hecho de que no observamos el producto correspondiente al alelo silvestre en la línea resistente NO-QAGE indica que todos los individuos analizados de la población son homocigotos para dicha mutación.

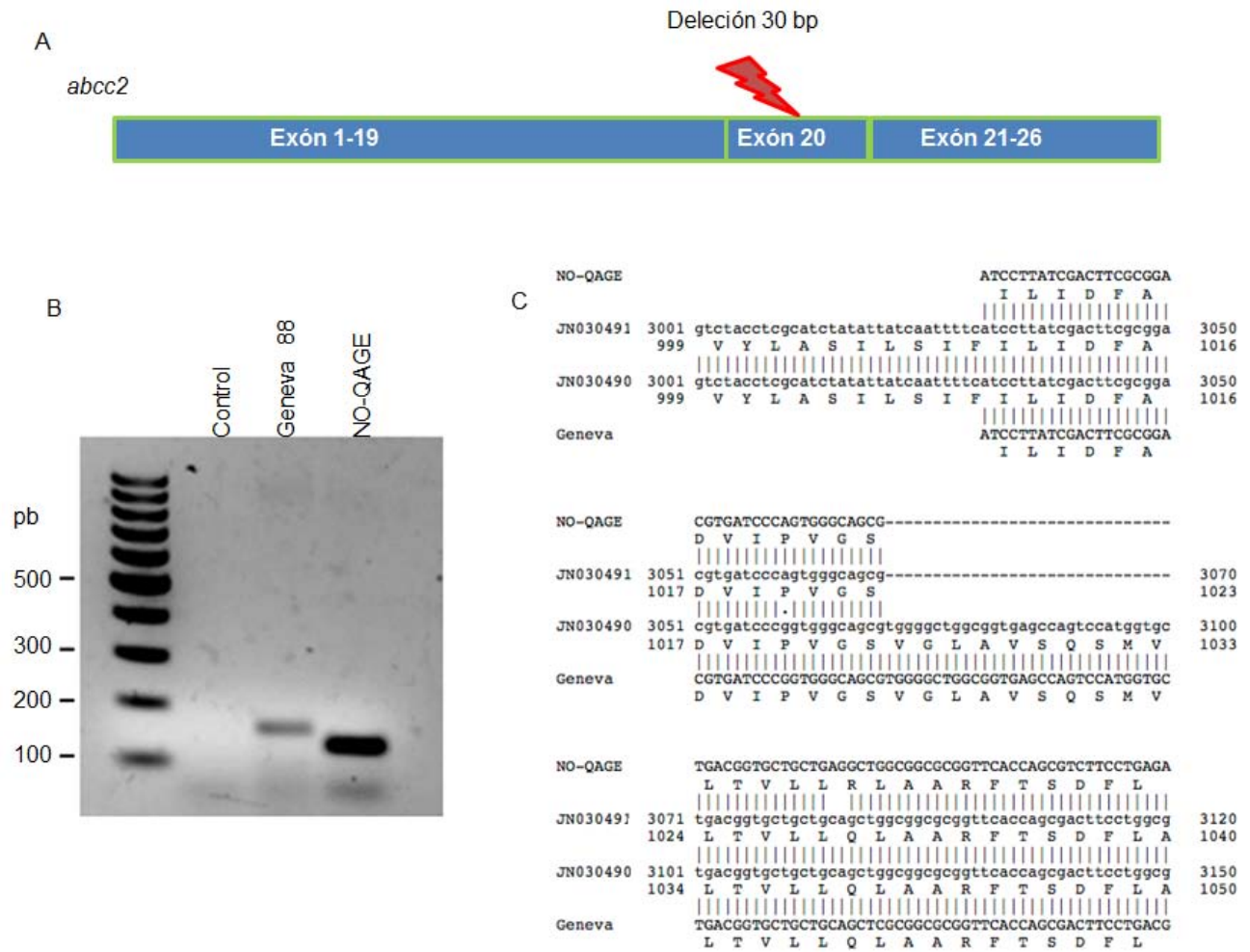


Figura 9. A) Representación esquemática del gen *ABCC2* y la región donde ocurre la delección en la población resistente NO-QAGE de *P. xylostella*. B) PCR del exón 20 del gen *ABCC2* de *P. xylostella*, se observa el producto esperado de 157 pb en la línea Geneva 88, en contraste la línea resistente NO-QAGE presenta un menor tamaño correspondiente al alelo mutante. Control: reacción de síntesis DNAC en ausencia de RNA. C) Alineamiento de las secuencias obtenidas de los productos de PCR con las secuencias de alelos silvestre y mutante del gen *ABCC2* reportados por Baxter y colaboradores (2011), la delección está indicada por la línea punteada.

## **Análisis de unión de las toxinas Cry1Ac y Cry1Ac Mod a VMMA de líneas susceptibles y resistentes de *P. gossypiella* y *P. xylostella***

Para determinar si ocurren alteraciones en la unión de las toxinas Cry1Ac y Cry1AcMod debido a la mutación en cadherina de la línea resistente AZP-R de *P. gossypiella* y a la delección en ABCC2 de la línea NO-QAGE de *P. xylostella*, se realizaron ensayos de unión de las toxinas activadas a vesículas de la microvellosidad media apical (VMMA) preparadas a partir del tejido intestinal de las líneas susceptibles y las líneas resistentes de ambas especies de insectos. Las toxinas Cry1Ac y Cry1AcMod se solubilizaron y activaron con tripsina, las toxinas activadas se purificaron por cromatografía de intercambio iónico como se describió en la sección de Materiales y Métodos. La Figura 10 muestra los picos de elución obtenidos en los cromatogramas durante la purificación del monómero de la toxina Cry1Ac silvestre (A) y de su variante modificada (B) estas fracciones fueron recuperadas y se analizaron en SDS-PAGE al 10% (C) para verificar la pureza de las muestras. Como se observa en la Figura 10C, la toxina Cry1Ac silvestre mostró una banda de ~60 kDa, mientras que la toxina Cry1Ac Mod mostró el patrón de bandeo característico de esta proteína que comprende bandas entre los ~72 kDa y ~52 kDa.

Las toxinas purificadas se marcaron con biotina para su detección. Analizamos la unión total de las de las proteínas Cry biotiniladas a VMMA de las cuatro líneas de insectos en ausencia y en presencia de 1000 excesos molares de la misma toxina sin marca (competencia homóloga). En el caso de *P. gossypiella* la toxina Cry1Ac silvestre y la toxina Cry1AcMod unen a las vesículas derivadas de la línea susceptible APHI-S (Figura 11A, carriles 1 y 3) y de la línea resistente AZP-R (Figura 11A, carriles 5 y 7). Cuando realizamos el ensayo de unión en presencia de un exceso de la misma toxina sin marca, la señal de las toxinas Cry1Ac y Cry1AcMod biotiniladas disminuye, lo cual indica que la unión de estas toxinas fue competida en las VMMA de ambas líneas de insectos, por lo tanto concluimos que la unión de ambas toxinas es específica en la línea susceptible APHI-S y en la línea resistente AZP-R (Figura 11A, carriles 2, 4, 6 y 8).

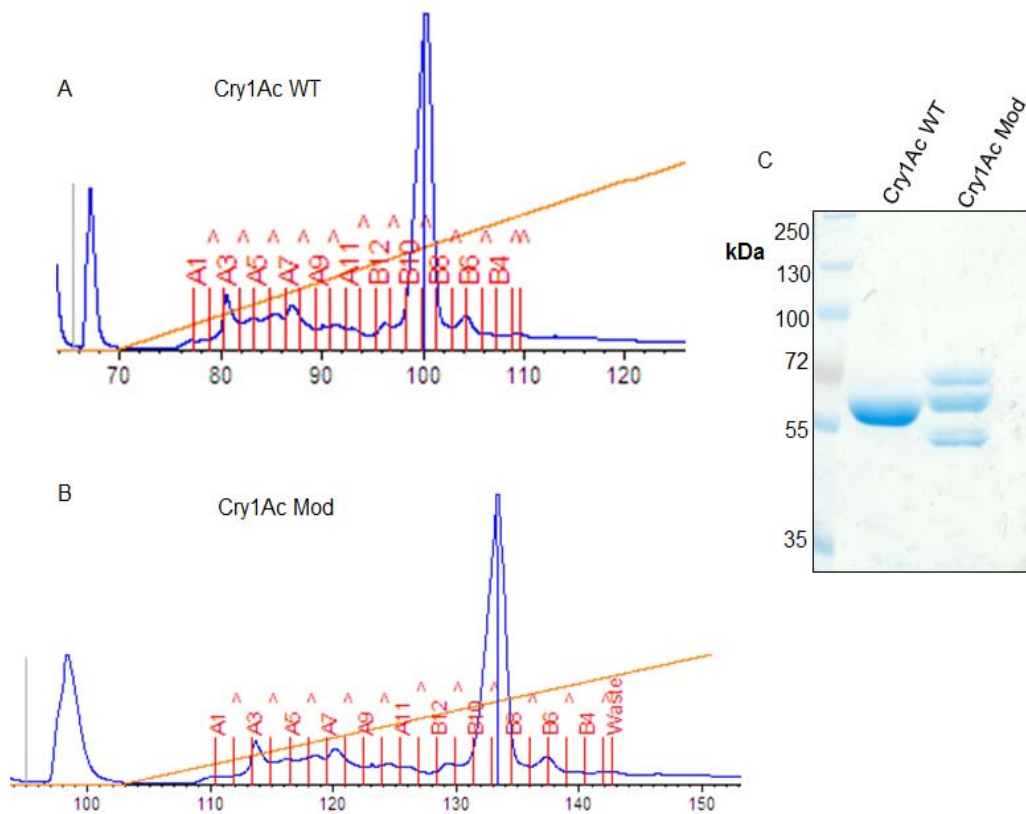


Figura 10. Cromatogramas obtenidos durante la purificación de los monómeros de las toxinas (A) Cry1Ac y (B) Cry1Ac Mod, la fracción que corresponde al pico de elución de las toxinas se analizó en (C) SDS-PAGE al 10%.

De manera similar, en *P. xylostella* observamos que la toxina Cry1Ac une a las VMMA de la línea susceptible Geneva 88 y de la línea resistente NO-QAGE (Figura 11B, carriles 1 y 3). Cuando realizamos un ensayo de competencia homóloga, observamos que disminuye la señal de la toxina Cry1Ac biotinilada en las VMMA de la línea Geneva 88 (Figura 11B, carril 2). En contraste, en el caso de la línea resistente NO-QAGE observamos que se mantiene la señal de la toxina Cry1Ac biotinilada al incubarse con el exceso de toxina sin marca (Figura 11B, carril 4). La observación de que la unión no se compete en la línea resistente NO-QAGE, indica que se pierde la unión específica. También analizamos la unión de la toxina Cry1AcMod a VMMA de ambas poblaciones de *P. xylostella*, observamos que esta toxina es capaz de unirse a la línea susceptible



Geneva 88 y a la línea resistente NO-QAGE (Figura 11B, carriles 5 y 7). Al hacer el ensayo de competencia homóloga, observamos que la unión de la toxina Cry1AcMod a las VMMA se compite por el exceso de toxina sin marca en la línea susceptible Geneva 88 y en la línea resistente NO-QAGE (Figura 11B, carril 4). En conclusión la toxina Cry1AcMod recupera la unión específica a las VMMA de la línea resistente NO-QAGE y esto conlleva una recuperación de la toxicidad.

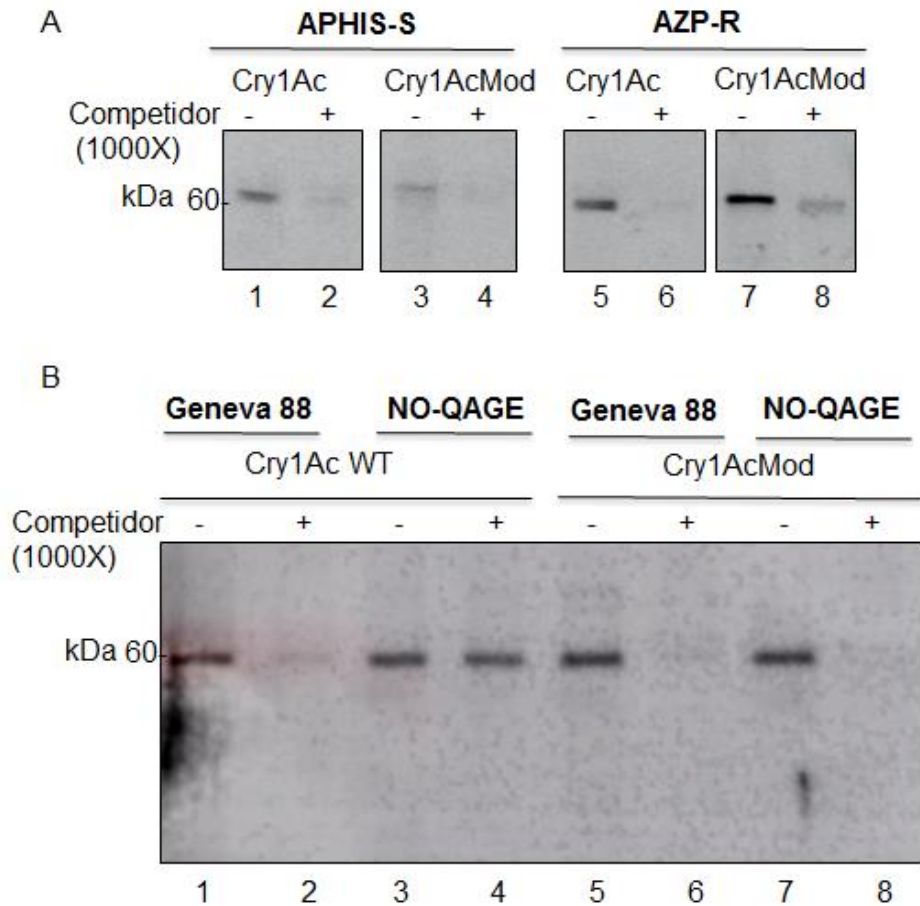


Figura 11. Unión de la toxinas Cry1Ac silvestre y Cry1AcMod a VMMA de la línea susceptible APHIS-S y a la línea resistente AZP-R de *P. gossypiella* (A); Y a la línea susceptible Geneva 88 y la línea resistente NO-QAGE de *P. xylostella* (B); en ausencia de competidor (-) o en presencia de 1000 excesos molares de la misma toxina sin marca (+).

## **Análisis de oligomerización de la toxina Cry1Ac en VMMA de las líneas susceptibles y resistentes de *P. gossypiella* y *P. xylostella***

La oligomerización e inserción de las toxinas Cry en la membrana son pasos críticos para que estas proteínas puedan ejercer su efecto tóxico. Se ha demostrado que un fragmento de cadherina de *M. sexta* es capaz de inducir la oligomerización de la toxina Cry1Ab *in vitro* (Gómez et al., 2014), y que la disrupción de cadherina conlleva resistencia a las toxinas Cry1A (Pardo-López et al., 2013). En el caso de resistencia asociada a mutaciones en el transportador ABCC2 se ha propuesto que el posible papel de esta molécula de membrana es unir al oligómero de la toxina Cry1Ac para promover su inserción en la membrana (Heckel, 2012). Sin embargo el hecho de que las toxinas Cry1AMod sean capaces de superar la resistencia asociada a mutaciones en el gen ABCC2 sugiere que su posible función es promover la oligomerización de estas proteínas de manera semejante a la cadherina ( Tabashnik et al., 2011). Por esta razón decidimos analizar la formación e inserción de oligómeros de la toxina Cry1Ac al ser incubada en presencia de VMMA de las cuatro líneas de insectos caracterizadas en este trabajo. La Figura 12 muestra una representación esquemática de los experimentos realizados. Para comparar la formación de oligómero entre líneas resistentes y susceptibles, analizamos el volumen total de la incubación mediante ensayos tipo western blot. En caso de que la formación del oligómero no esté afectada en las líneas resistentes, observaríamos una proporción similar de este complejo molecular al comparar con las líneas susceptibles.

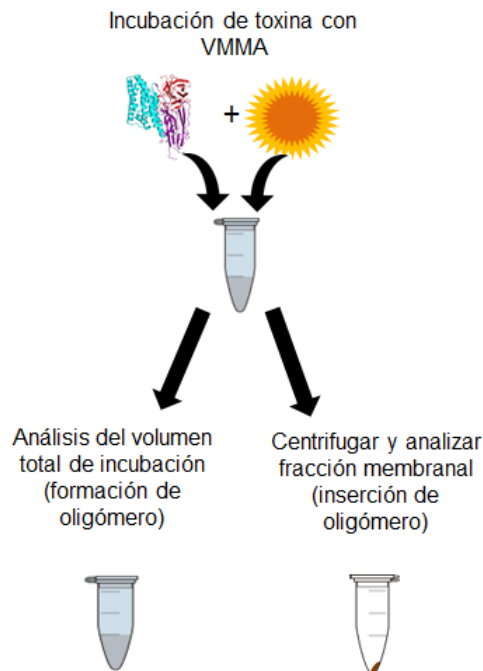


Figura 12. Esquema experimental del análisis de formación e inserción de oligómeros de la toxina Cry1Ac en VMMA de las cuatro líneas de insectos analizadas.

Primeramente analizamos la oligomerización de la toxina Cry1Ac al incubarla con VMMA de las líneas susceptibles y resistentes de *P. gossypiella* y *P. xylostella*. Como se observa en la Figura 13 las VMMA de las líneas susceptibles Geneva 88 de *P. xylostella* y APHIS-S de *P. gossypiella* promueven la formación de oligómeros de ~200 kDa (carriles 4 y 8) esto contrasta con las respectivas poblaciones resistentes NO-QAGE y AZP-R, en las cuales la formación de oligómero es menos eficiente (Figura 13 carriles 5 y 9), al incubar las VMMA de las cuatro líneas de insectos en ausencia de toxina Cry1Ac no detectamos señal de esta proteína (Figura 13, carriles 2, 3, 6 y 7), la toxina Cry1Ac incubada en ausencia de VMMA no forma oligómeros. Los resultados sugieren que la formación de oligómero se encuentra afectada en las líneas resistentes. En el caso de *P. xylostella* la formación eficiente de oligómeros depende del transportador ABCC2, mientras que en el caso de *P. gossypiella* la formación eficiente de oligómeros depende de cadherina.

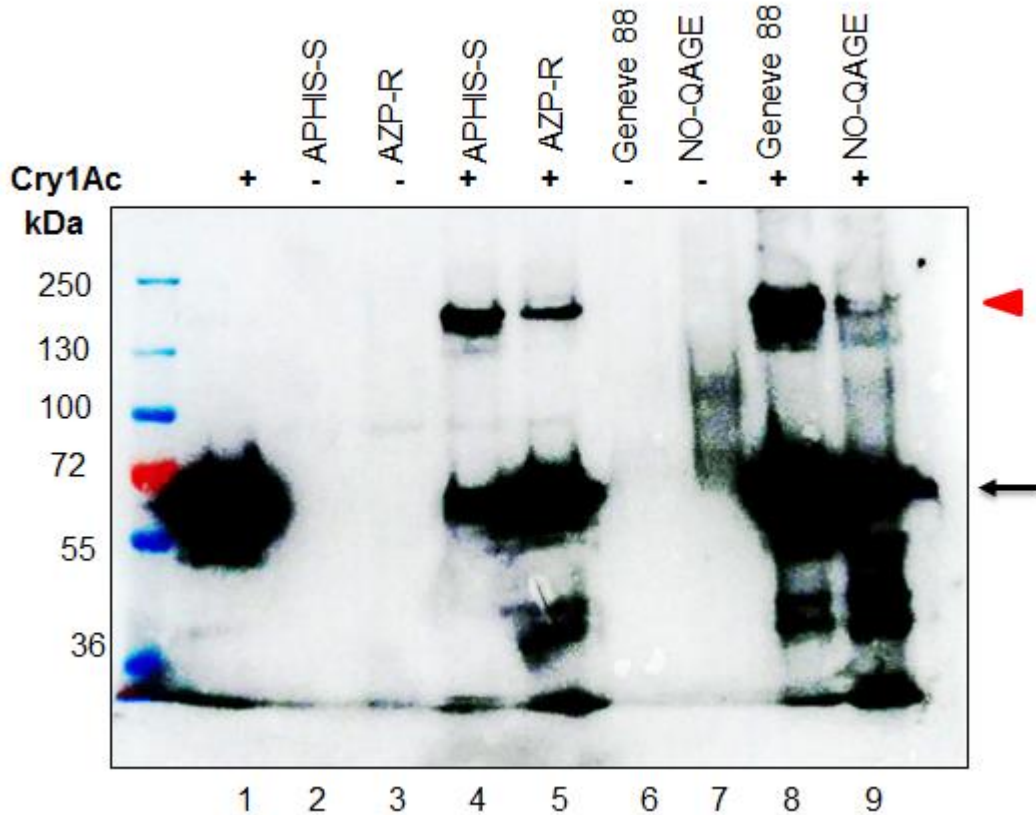


Figura 13. Oligomerización de la toxina Cry1Ac silvestre en presencia de VMMA derivadas de las líneas susceptibles Geneva 88 de *P. xylostella* y APHIS-S de *P. gossypiella*, y las líneas resistentes NO-QAGE de *P. xylostella* y AZP-R de *P.gossypiella*. La oligomerización de la toxina Cry1Ac silvestre es menos eficiente en ambas líneas resistentes (carriles 5 y 9) ya que muestran menor cantidad de oligómero (cabeza de flecha roja). Como control se incluyó a la toxina en ausencia de VMMA (carril 1) y a las VMMA de las cuatro líneas de insectos en ausencia de toxina (carriles 2, 3, 6, y 7). El monómero es indicado por la flecha negra, además se observan bandas de un tamaño < 55 kDa que pueden corresponder a posibles productos de degradación de la toxina.

Para analizar la inserción de oligómeros en la membrana realizamos el experimento incubando la toxina Cry1Ac en presencia de VMMA de las cuatro líneas de insectos, con la diferencia de que las membranas se recuperan mediante centrifugación descartando el sobrenadante (Figura 12). Analizamos las pastillas obtenidas mediante western blot para verificar la presencia de oligómeros de la toxina Cry1Ac. En el caso

de *P. xylostella* los resultados que obtuvimos mostraron la presencia de un oligómero de la toxina Cry1Ac silvestre (~200 kDa) en vesículas aisladas a partir de la línea susceptible Geneva 88 (Figura 14A, carril 3), en contraste en el caso de la línea resistente NO-QAGE observamos una menor cantidad de oligómero asociado a la membrana (Figura 14A, carril 4), cuando las VMMA se incuban en ausencia de toxina Cry1Ac no detectamos señal de la proteína (Figura 14A, carriles 1 y 2), la toxina Cry1Ac no forma oligómeros en ausencia de VMMA (Figura 14A, carril 5) y solo observamos la forma monomérica. Obtuvimos resultados similares al realizar el experimento con las VMMA derivadas de la línea susceptible APHIS-S y la línea resistente AZP-R de *P. gossypiella*, en este caso observamos la presencia de un oligómero de ~200 kDa de la toxina Cry1Ac en la línea susceptible APHIS-S (Figura 14B, carril 3), sin embargo la cantidad de este complejo de alto peso molecular es menor en la línea resistente AZP-R (Figura 14B, carril 4), cuando incubamos las VMMA en ausencia de toxina Cry1Ac no se detecta señal de la proteína (Figura 14B, carriles 1 y 2), al incubar la toxina Cry1Ac en ausencia de VMMA no se detectan oligómeros, únicamente se observa el monómero (Figura 14B, carril 5). Cuando analizamos la membrana recuperada mediante centrifugación, la menor cantidad de oligómeros de la toxina Cry1Ac que se asocian a las VMMA de las líneas resistentes NO-QAGE de *P. xylostella* y AZP-R de *P. gossypiella*, concuerda con la observación del experimento anterior, en el cual determinamos que ambas líneas resistentes NO-QAGE y AZP-R se encuentran afectadas en la formación de oligómero a partir de la toxina Cry1Ac (Figura 13). Es importante resaltar que al analizar la fracción membranal observamos nula o baja cantidad de la forma monomérica de la toxina Cry1Ac, esto indica que la forma oligomérica es la que preferencialmente se asocia a la membrana. En conjunto con los resultados previos, los ensayos indican que el receptor tipo cadherina y el transportador ABCC2 se encuentran involucrados en la oligomerización de la toxina Cry1Ac. No obstante, en el caso del transportador ABCC2 se ha propuesto que está involucrado en la inserción del oligómero en la membrana y la observación de una menor cantidad de oligómeros de la toxina Cry1Ac en las VMMA de la población resistente NO-QAGE, podría ser consecuencia de un defecto en la inserción del complejo pre-poro oligomérico. Para averiguar si el transportador ABCC2 también

participa en la inserción del oligómero en la membrana en *P. xylostella*, analizamos la asociación de oligómeros preformados a VMMA de las líneas Geneva 88 y NO-QAGE de *P. xylostella*.

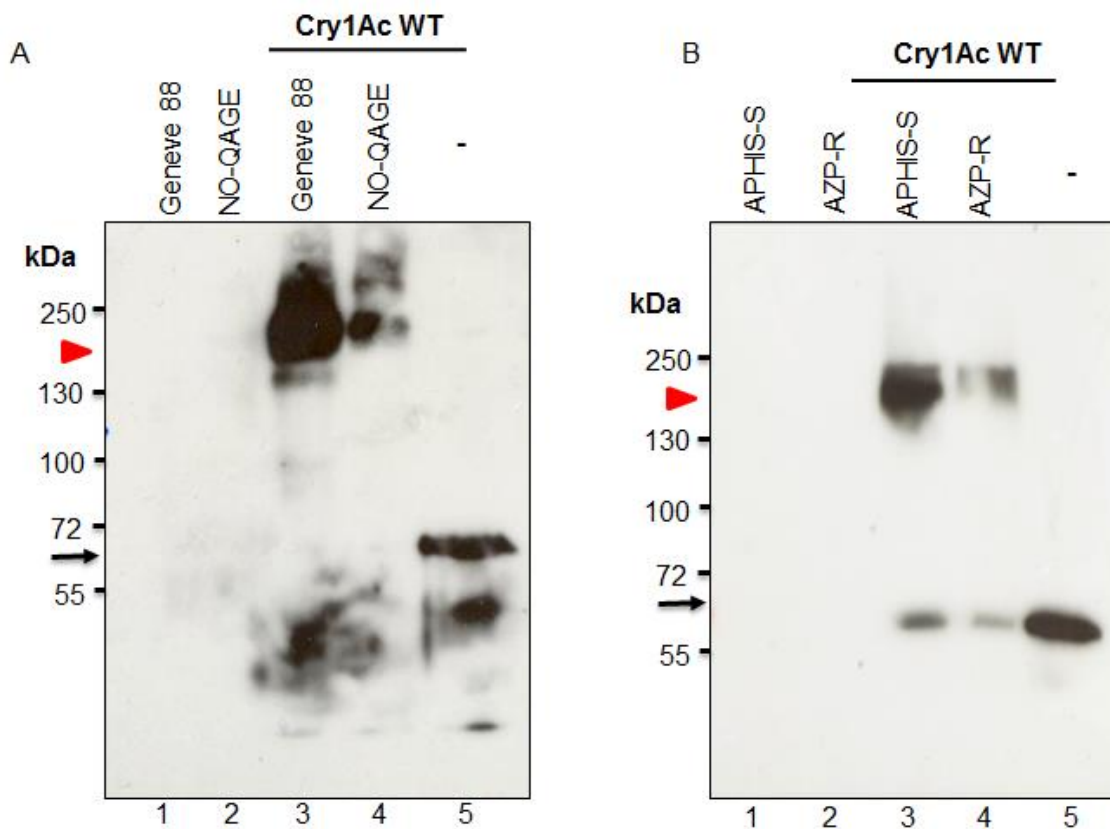


Figura 14. Inserción de oligómeros (cabeza de flecha roja) de las toxinas Cry1Ac en A) VMMA's de las líneas Geneva 88 (susceptible) y NO-QAGE (resistente) de *P. xylostella*. B) VMMA's de las líneas APHIS-S (sensible) y AZP-R (resistente) de *P. gossypiella*. Se observa una baja o nula presencia de monómero asociado a las membranas (flechas negras).

## **Asociación de Oligómeros de la toxina Cry1Ac preformados en solución a VMMA de la línea susceptible y resistente de *P. xylostella***

Es posible inducir la oligomerización de la toxina Cry1Ab al incubarla en presencia de un fragmento de cadherina de *M. sexta* que comprende los repetidos del 7 al 12 (CR7-CR12) (Gómez et al., 2014), este fragmento contiene los sitios de interacción con la toxina Cry1Ab que promueven el cambio conformacional que detona la oligomerización (Gómez et al., 2014). Para obtener evidencia adicional que nos permitiera determinar si el transportador ABCC2 participa en la inserción del oligómero en la membrana de las células intestinales de *P. xylostella*, realizamos una curva de asociación de oligómeros de la toxina Cry1Ac preformados en solución, a las VMMA de la líneas susceptible Geneva 88 y la línea resistente NO-QAGE mutante en ABCC2 de *P. xylostella*. Si el transportador ABCC2 es necesario para la inserción de los oligómeros, en la línea resistente (NO-QAGE) observaríamos una menor intensidad de la banda correspondiente al complejo de alto peso molecular de ~200kDa al recuperar la fracción membranal mediante centrifugación, al comparar con la línea susceptible (Geneva 88). Primeramente purificamos el fragmento de cadherina CR7-CR12 expresado en la cepa de *E. coli* BL21, la expresión del fragmento se induce adicionando IPTG al medio de cultivo (Figura 15A). La purificación se realizó como se describe en la sección de Materiales y Métodos, las fracciones colectadas de la elución con 250 mM imidazol se analizaron en SDS-PAGE al 10% (Figura 15B), el fragmento CR7-CR12 corresponde a la banda de 76 kDa.

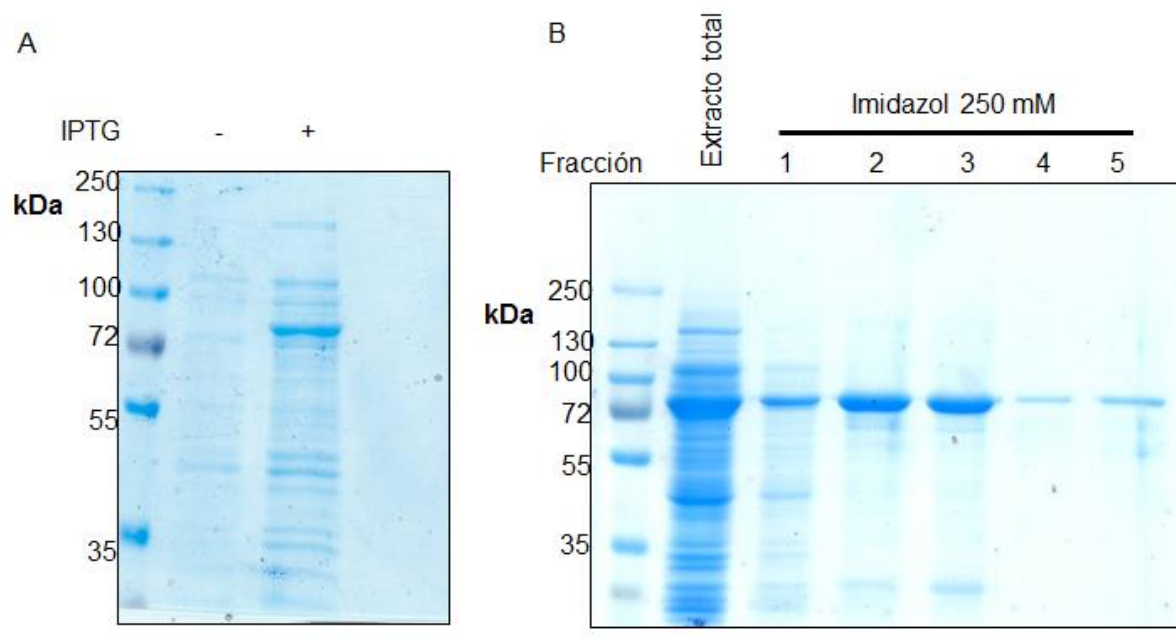


Figura 15. A) Expresión del fragmento de cadherina CR7-CR12 en la cepa de *E. coli* BL21. B) SDS-PAGE de las fracciones del fragmento de cadherina CR7-CR12 obtenidas de la purificación.

Una vez que obtuvimos el fragmento de cadherina CR7-CR12 puro, analizamos la asociación de oligómeros de la toxina Cry1Ac preformados en solución, a las VMMA de las líneas susceptible Geneva 88 y resistente NO-QAGE de *P. xylostella*. La toxina Cry1Ac se incubó en presencia del fragmento de cadherina CR7-CR12 de *M. sexta* para inducir la oligomerización en solución. (Figura 16, carril 3). Posteriormente a esta mezcla añadimos las VMMA de la población susceptible Geneva 88 de *P. xylostella* o de la línea resistente NO-QAGE obteniendo un volumen final de 50  $\mu$ l, así mismo se incluyeron muestras de esta mezcla que fueron diluidas dos y cinco veces con buffer de carbonatos, para obtener un volumen final de 100 y 250  $\mu$ l respectivamente. Incubamos las muestras durante 1 hora adicional para permitir la asociación de los oligómeros preformados a la membrana. Recuperamos las membranas centrifugando y detectamos la presencia de oligómeros en las pastillas mediante ensayos tipo western blot para evaluar la inserción. Cuando los oligómeros preformados de la toxina Cry1Ac se incuban con las VMMA sin diluir, observamos una cantidad similar de oligómeros de la toxina Cry1Ac asociados a las VMMA de la línea



susceptible Geneva 88 y la línea resistente NO-QAGE (Figura 16, carriles 6 y 7). Con la finalidad analizar la inserción en condiciones no saturantes realizamos un ensayo de asociación de oligómeros preformados empleando diluciones seriales de 2 y 5 veces el volumen total de la muestra, bajo estas condiciones observamos una menor cantidad de oligómeros preformados asociados a las VMMA de la línea resistente NO-QAGE en comparación con la línea susceptible Geneva 88 (Figura 16, carriles 8 y 9; 10 y 11). La observación de que los oligómeros preformados de la toxina Cry1Ac se incorporan con menor eficiencia en las VMMA de la población resistente NO-QAGE, indica que el transportador ABCC2 también facilita la inserción del oligómero en la membrana. Es importante destacar que a pesar de que la cantidad de oligómeros preformados es significativamente menor en la población NO-QAGE, se logra detectar la presencia de este complejo de alto peso molecular, sugiriendo que la inserción en membrana no se abate por completo (Figura 16, carriles 9 y 11). En conjunto con los resultados anteriores, determinamos que en la línea NO-QAGE de *P. xylostella* la resistencia a la toxina Cry1Ac se debe a una deficiencia en la formación e inserción de oligómeros en la membrana.

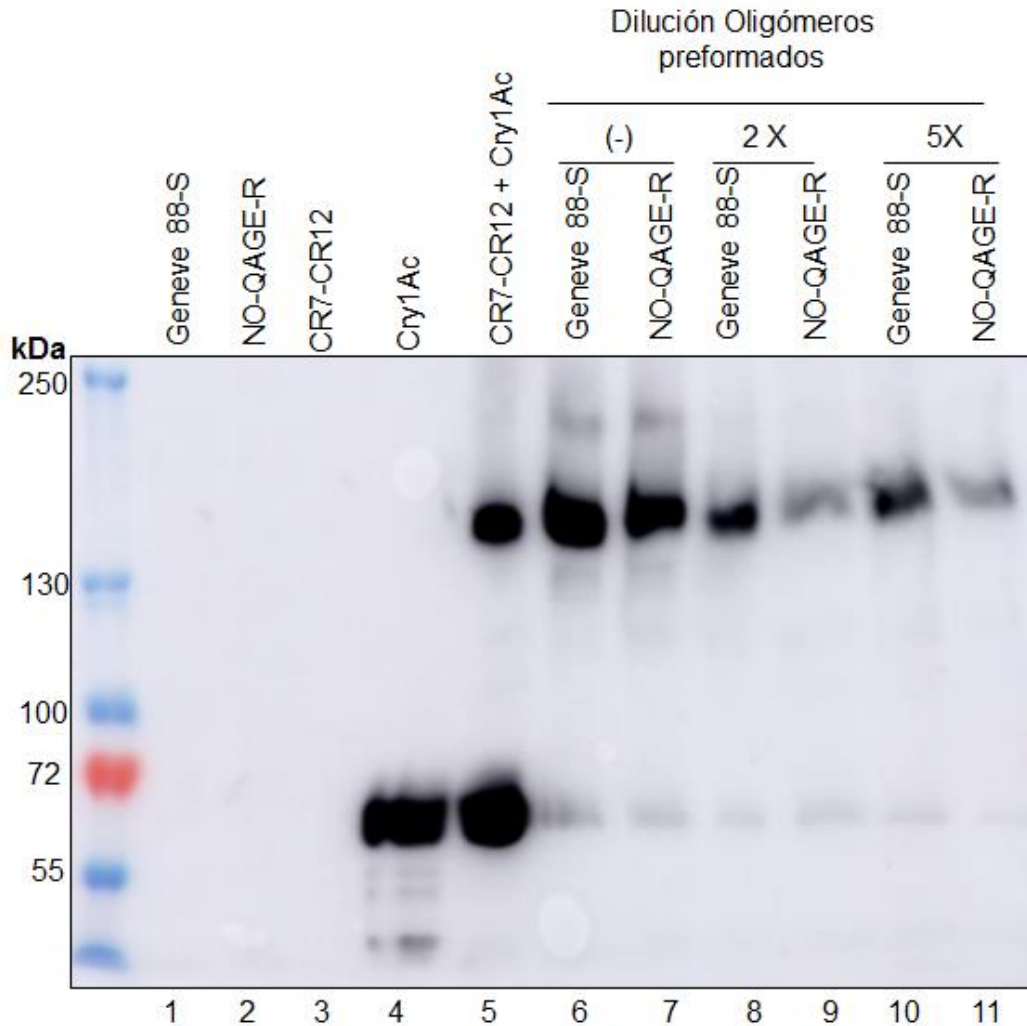


Figura 16. Asociación de oligómeros preformados en solución a VMMA de las líneas susceptible (Geneve 88) y resistente (NO-QAGE) de *P. xylostella*, los oligómeros preformados se inserten con una eficiencia similar en ambas líneas (carriles 6 y 7) cuando el ensayo se realiza en condiciones de saturación (sin diluir). En contraste cuando realizamos el experimento en condiciones no saturantes (diluciones de 2 y 5 veces el volumen total), observamos que los oligómeros preformados de la toxina Cry1Ac se asocian con menor eficiencia en la línea resistente NO-QAGE (carriles 9 y 11) al comparar con la línea susceptible (carriles 8 y 10) Controles: VMMA en ausencia de oligómeros preformados (carriles 1 y 2) CR7-CR12 en ausencia de toxina (carril 3), toxina en ausencia de CR7-CR12 (carril 4), y toxina en presencia del fragmento de cadherina CR7-CR12 (carril 5).

## **Análisis de oligomerización de la toxina Cry1AcMod en VMMA de la líneas susceptibles y resistentes de *P. gossypiella* y *P. xylostella***

Las toxinas Cry1AMod son efectivas contra poblaciones que presentan distintos mecanismos genéticos de resistencia a las toxinas Cry. La toxina Cry1AcMod es capaz de superar la resistencia de la población NO-QAGE de *P. xylostella* asociada a mutaciones en el transportador ABCC2, así como la resistencia de la población AZP-R de *P. gossypiella* asociada a mutaciones en cadherina (Tabashnik et al., 2011). Para comprender cómo es que la toxina Cry1AcMod supera la resistencia asociada a las mutaciones en cadherina y en el transportador ABCC2 en los lepidópteros *P. gossypiella* y *P. xylostella* respectivamente, realizamos un análisis de la oligomerización de esta toxina en VMMA de las líneas susceptibles y resistentes de ambos insectos. Previamente se reportó que la formación de oligómeros a partir de toxina activada Cry1AbMod es menos eficiente si se compara con la formación de oligómero a partir de protoxina (Gómez et al., 2014), por esta razón realizamos el experimento incubando 1.5 µg de toxina Cry1AcMod activada con las VMMA de las poblaciones susceptibles y resistentes de ambos insectos. Recuperamos las membranas centrifugando las muestras y detectamos la presencia de oligómeros de la toxina Cry1AcMod en las pastillas que obtuvimos mediante western blot con un anticuerpo anti-Cry1Ac. Los resultados se muestran en la Figura 17A, la toxina Cry1AcMod forma oligómeros de ~200 kDa que se asocian a las VMMA de las líneas susceptibles Geneva 88 y APHIS-S, y a las líneas resistentes NO-QAGE y AZP-R (Figura 17A, carriles 3, 4, 7 y 8). Si incubamos las vesículas en ausencia de toxina Cry1AcMod no detectamos oligómeros (Figura 17A, carriles 1, 2, 5 y 6), asimismo se muestra que la toxina Cry1AcMod oligomeriza en ausencia de VMMA (Figura 17A, carril 9). Estos resultados contrastan con lo que observamos en el caso de la toxina Cry1Ac utilizando la misma cantidad de 1.5 µg de toxina activada para el ensayo de oligomerización, en concordancia con nuestros resultados anteriores observamos una menor cantidad de oligómeros en las VMMA de las poblaciones resistentes NO-QAGE de *P. xylostella* (Figura 17B, carril 4) y AZP-R de *P. gossypiella* (Figura 17B, carril 8), al comparar con sus respectivas poblaciones susceptibles Geneva 88 y APHIS-S (Figura 17B carriles 3 y 7). Los

resultados que obtuvimos demuestran que la toxina Cry1AcMod logra superar la resistencia asociada a mutaciones en el transportador ABCC2 al ser capaz de formar oligómeros en ausencia de receptor, que se asocian a la membrana de las líneas resistentes NO-QAGE y AZP-R.

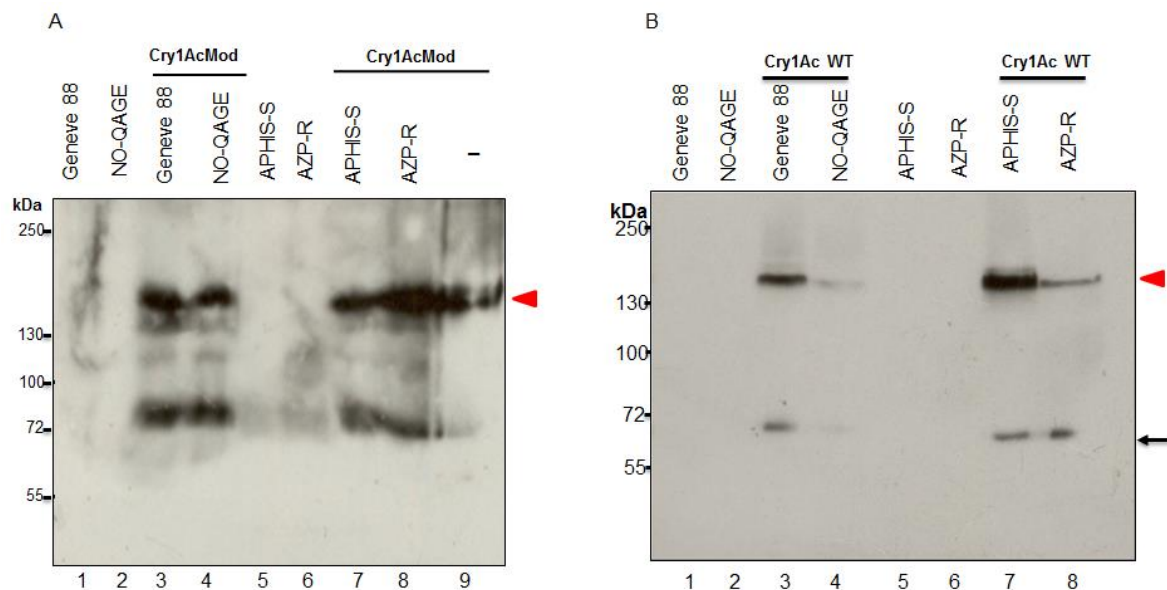


Figura 17. A) Oligomerización de la toxina Cry1AcMod en las líneas susceptibles y resistentes de *P. xylostella* y *P. gossypiella*, la toxina Cry1AcMod es capaz de formar oligómeros de ~200 kDa a partir de 1.5 µg de toxina activada en las VMMA de las cuatro poblaciones de insectos analizadas. B) Oligomerización de 1.5 µg de toxina Cry1Ac en las VMMA de las poblaciones susceptibles y resistentes de *P. xylostella* y *P. gossypiella*, la toxina Cry1Ac silvestre forma oligómeros con mayor eficiencia en las poblaciones susceptibles. Los oligómeros se indican con la cabeza de flecha roja, el monómero se indica con la flecha negra.

## Discusión

La aparición de resistencia en insectos plaga pone en riesgo el uso biotecnológico de las toxinas Cry (Pardo-López et al., 2013). Entender las alteraciones en el mecanismo de acción de estas toxinas en insectos resistentes nos permitirá diseñar estrategias para contender con eventos de aparición de resistencia en el campo. En este trabajo comparamos la unión, oligomerización y capacidad de inserción de la toxina Cry1Ac en dos especies de lepidópteros que presentan distintos mecanismos genéticos de resistencia a la toxina Cry1Ac.

En el caso de *P. gossypiella* la mutación por delección en el gen de cadherina confiere altos niveles de resistencia a la toxina Cry1Ac (Morin et al., 2003). Hasta donde tenemos conocimiento este es el primer estudio que demuestra un vínculo entre resistencia y deficiencias en la oligomerización de la toxina Cry1Ac, dado que la mayoría de los estudios de oligomerización se han realizado en insectos susceptibles (Pacheco et al., 2009; Peng et al., 2010). Con la excepción de un estudio en *H. armigera* en el cual se analizó la oligomerización y se determinó que no existían diferencias entre VMMA de una línea susceptible (96S) y una línea resistente (LF120) (Li et al., 2012). El mecanismo de resistencia en la cepa LF120 se desconoce. Nuestros resultados revelaron la falta de expresión de cadherina en la línea AZP-R en comparación a la línea susceptible APHIS-S (Figura 8A), esto es consistente con reportes previos de mutaciones por delección que provocan la disrupción de cadherina en *P. gossypiella* (Morin et al., 2003). Además encontramos que la unión específica era similar entre las VMMA derivadas de la línea susceptible APHIS-S así como de la línea resistente AZP-R (Figura 11A), esto concuerda con resultados previos en los que se observó que no existían diferencias en la unión de la toxina Cry1Ac a las VMMA de las líneas APHIS-S y AZPR de *P. gossypiella* (González-Cabrera et al., 2003). Una posible explicación a este fenómeno es de que además de la cadherina, en la membrana de la célula blanco existen otras proteínas con la capacidad de establecer interacción con la toxina Cry1Ac, sin embargo esta unión no es suficiente para conferir susceptibilidad a la toxina en la línea AZP-R. Otro dato interesante es que a pesar de

que la oligomerización de la toxina Cry1Ac es menos eficiente en la línea AZP-R, ésta no es abolida por completo (Figura 13 carriles 4 y 5), probablemente existen otras moléculas de membrana que pueden facilitar la oligomerización de la toxina Cry1Ac en *P. gossypiella*. No obstante, la cadherina juega un papel preponderante en promover el paso de oligomerización del mecanismo de acción en *este* lepidóptero.

En la literatura se proponen dos modelos de oligomerización, uno de ellos plantea que el monómero es la entidad molecular que se inserta en la membrana para después oligomerizar , en contraste el segundo modelo que propone la formación de un complejo pre-poro oligomérico que posteriormente se inserta en membrana (Vachon et al., 2012). En nuestros experimentos observamos una nula o baja presencia de monómero cuando las VMMA se recuperan por centrifugación y sólo se analiza la fracción membranal (Figura 14), esto contrasta con lo que observamos cuando analizamos el volumen total de incubación sin centrifugar, condición en la que detectamos una mayor proporción de monómero (Figura 13, carriles 4 y 5). Este resultado apoya la hipótesis de que el complejo oligomérico es el que se inserta de manera preferencial en la membrana. La pequeña proporción de monómeros que observamos en algunas muestras de fracción membranal analizadas, pueden deberse al desensamble de algunas de las estructuras oligoméricas debido al tratamiento con calor previo a cargar en SDS-PAGE, se ha demostrado que los oligómeros formados a partir de toxina Cry1Ab activada se desensamblan al ser tratados con temperaturas superiores a los 50°C, llevando el complejo de alto peso molecular a su forma monomérica (Gómez et al., 2014)..

La toxina Cry1AcMod tiene mayor potencia que la toxina Cry1Ac en la línea AZP-R de *P. gossypiella* (Soberón et al., 2007; Tabashnik et al., 2011). En este estudio demostramos que la toxina Cry1AcMod supera la resistencia asociada a la mutación en cadherina de la línea AZP-R, debido a su capacidad de formar oligómeros en ausencia de este receptor y que estos son capaces de insertarse en la membrana de la población resistente AZP-R así como en la membrana de la población susceptible APHIS-S (Figura 17 A carriles 7 y 8). Estos experimentos los realizamos con 1.5 µg de toxina Cry1AcMod debido a que se demostró que esta toxina es menos eficiente que la

toxina Cry1Ac para formar oligómeros a partir de toxina activada en VMMA de *M. sexta* (Gómez et al., 2014). Para descartar un posible artefacto, a manera de control realizamos el experimento con la toxina Cry1Ac empleando la misma cantidad de 1.5 µg de toxina, en contraste a la toxina Cry1AcMod, la toxina Cry1Ac oligomeriza con menor eficiencia en la línea resistente AZP-R al comparar con la línea susceptible APHIS-S (Figura 17B). El hecho de que se necesita una mayor cantidad de toxina Cry1AcMod activada para formar oligómeros, podría explicar porque las toxinas modificadas pierden potencia en contra de la mayoría de las poblaciones susceptibles de insectos (Tabashnik et al., 2011), también se puede especular que la delección en el N-terminal de las toxinas CryMod no representa el corte proteolítico óptimo, ya que estas proteínas se diseñaron con base en el procesamiento *in vitro* con tripsina (Soberón et al., 2007), no obstante en el jugo gástrico está presentes otras serina proteasas que podrían procesar adicionalmente a las toxinas Cry. Así mismo la delección de la hélice  $\alpha$ -1 podría generar un cambio conformacional en la toxinas CryMod que afecte la interacción con los receptores, en el caso de la toxina Cry1AbMod se ha observado que la toxina activada es incapaz de unirse al fragmento de cadherina CR7-12 de *M. sexta* a diferencia de su contraparte nativa (Gómez et al., 2014). Sin embargo a pesar de ello las toxinas CryMod al poder oligomerizar en ausencia de receptor, son efectivas en contra de los insectos resistentes teniendo una mayor potencia que sus contrapartes nativas (Tabashnik et al., 2011)

Los resultados que obtuvimos con la toxina Cry1Ac y la toxina Cry1AcMod apoyan la hipótesis de que la oligomerización es un paso importante en el modo de acción de esta toxina y que el ensamble eficiente del oligómero depende del receptor cadherina en *P. gossypiella*. En contraste en el caso reportado de *H. armígera* donde no se observaron diferencias significativas en la oligomerización, se encontró que la expresión de cadherina era similar entre la línea resistente LF120 y la línea susceptible 96S, y solo existen diferencias en un aminoácido al comparar las secuencias de ambas proteínas, adicionalmente se reportó que la línea LF120 posee una actividad reducida de ALP y esto correlaciona con una disminución en la expresión de esta proteína (Chen et al., 2015; LI et al., 2012). Se puede especular que el paso del

mecanismo de acción que se interrumpe en la línea LF120 de *H. armigera* es la inserción de la toxina en la membrana, en *Manduca sexta* se tiene evidencia de que ALP es importante para que ocurra este paso del mecanismo de acción (Arenas et al., 2010), adicionalmente se ha observado que el silenciamiento de ALP genera tolerancia a la toxina Cry1Ab (Flores-Escobar et al., 2013). Al comparar los resultados que obtuvimos la línea AZP-R de *P. gossypiella* con las observaciones reportadas en línea LF120 de *H. armigera*, podemos suponer que la asociación entre resistencia y deficiencias en la oligomerización depende del mecanismo genético de resistencia, de la toxina que se analiza y de la especie de insecto estudiada.

A pesar de que diversos reportes asocian mutaciones en el transportador ABCC2 con resistencia a las toxinas Cry, el papel del transportador ABCC2 en el modo de acción de estas proteínas permanecía sin determinar. La caracterización de la unión de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac en distintas líneas resistentes de diferentes especies de lepidópteros, sugirieron que el transportador ABCC2 funciona como un receptor de toxinas Cry, ya que en la mayoría de los casos se observan afectaciones en la unión de al menos una toxina Cry1A a VMMA de líneas cuya resistencia se encuentra ligada a mutaciones en el transportador ABCC2 (Gahan et al., 2010; Wang et al., 2007). En concordancia con estos estudios se demostró que el transportador ABCC2 es una proteína de unión a las toxinas Cry (Bretschneider et al., 2016; Tanaka et al., 2013; Zhou et al., 2016). Para determinar el posible papel del transportador ABCC2 en el modo de acción de la toxina Cry1Ac comparamos la unión y oligomerización y capacidad de inserción de la toxina Cry1Ac y su variante Cry1AcMod entre VMMA de una población susceptible y de una población de *P. xylostella* resistente a la toxina Cry1Ac que posee una delección en el transportador ABCC2. Primeramente confirmamos la presencia del alelo mutante *ABCC3* en la línea NO-QAGE empleada en este estudio. Este análisis reveló la ausencia del fragmento correspondiente al alelo silvestre en el cDNA NO-QAGE, lo que nos permite concluir que la población es homocigota para el alelo mutante que posee la delección de 30 bp en el gen ABCC2 (Figura 9). Adicionalmente determinamos mediante western blot que el receptor cadherina se expresa en las líneas Geneva 88 y NO-QAGE de *P. xylostella* (Figura 8B).



Por lo cual las afectaciones que observamos en este estudio son atribuibles únicamente a la delección en el exón 20 del transportador ABCC2.

El análisis de la unión de la toxina Cry1Ac a VMMA de la línea susceptible Geneva 88 y la línea resistente NO-QAGE, reveló que en el caso de la línea resistente NO-QAGE la unión específica de la toxina se pierde ya que no se compite por el exceso de toxina sin marca. Esto contrasta con la unión de la toxina Cry1AcMod, esta toxina recupera la unión específica a las VMMA de la población resistente NO-QAGE (Figura 11B). La población NO-QAGE fue establecida a partir de la cruce de la línea NO-QA con la población Geneva 88, seguido de una selección de la progenie F3 con la toxina Cry1Ac (Tabashnik et al., 2000). Análisis de unión previos utilizando a las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac marcadas con yodo radioactivo mostraron una reducción en la unión de ambas toxinas a las VMMA de la línea NO-QA (Ferré et al., 1991). Nuestros resultados muestran que la resistencia a la toxina Cry1Ac en la línea NO-QAGE correlaciona con la pérdida de unión específica, y que la toxina Cry1AcMod recupera la unión específica a las VMMA, recuperando la toxicidad. La discrepancia en ensayos de unión previos a VMMA de la población NO-QA y los que realizamos en este estudio podrían deberse a que la población NO-QAGE haya cambiado a lo largo de los años respecto a la línea parental a partir de la cual fue establecida. El análisis de la unión de la toxina Cry1C a VMMA de la población resistente XenR de *S. exigua*; que posee una mutación por delección en el transportador ABCC2, reveló que la unión total de la toxina Cry1C no se encuentra significativamente reducida en esta línea, no obstante la unión no es específica ya que solo se compite parcialmente por un exceso de la misma toxina sin marca (Youngjin Park et al., 2014). Este dato concuerda con la pérdida de unión específica de la toxina Cry1Ac que observamos en las VMMA de línea resistente NO-QAGE de *P. xylostella* debido a la mutación en el transportador ABCC2. Resulta interesante que la unión toxina Cry1Ac no se compita por el exceso de toxina sin marca, y se puede especular que existe(n) otra(s) molécula(s) con las cuales la toxina Cry1Ac puede interactuar en las VMMA de la línea resistente NO-QAGE de *P. xylostella*, sin embargo la interacción no tiene relevancia en el mecanismo de acción, de manera general la unión de las toxinas Cry a las VMMA de su especie blanco correlaciona con

su actividad insecticida. Sin embargo esta correlación no se observa en todos los casos, por ejemplo en *Lymantria dispar* se reportó que la toxina Cry1Ac es menos tóxica que la toxina Cry1Ab a pesar de tener una mayor afinidad de unión a las VMMA de este insecto (Pigott & Ellar, 2007). Es posible que en diversos casos existan proteínas que son capaces de establecer interacción con las toxinas Cry sin que estas se involucren en el mecanismo de acción.

También analizamos la oligomerización e inserción de oligómeros de la toxina Cry1Ac al incubarla en presencia de VMMA derivadas de la línea susceptible Geneva 88 y de la línea resistente NO-QAGE de *P. xylostella*. En el presente estudio reportamos que la oligomerización de la toxina Cry1Ac es menos eficiente en las VMMA de la línea NO-QAGE lo cual correlaciona con el fenotipo de resistencia a esta toxina. Al analizar la cantidad de oligómeros que se forman en muestras donde las VMMA no se recuperan mediante centrifugación, observamos que hay una reducción en la oligomerización en la línea resistente NO-QAGE al compararla con la línea susceptible Geneva 88 (Figura 13), indicando que el transportador ABCC2 facilita la oligomerización de la toxina Cry1Ac. Cuando el experimento se realizó centrifugando las muestras y analizando la fracción membrana recuperada, también observamos una menor cantidad de oligómeros en la línea resistente NO-QAGE al comparar con la línea susceptible (Figura 14). Previamente se ha demostrado que la unión irreversible de la toxina Cry1Ab a VMMA de *M. sexta* se debe a la inserción del oligómero en la membrana (Gómez et al., 2014). En concordancia con esto, observamos que la menor eficiencia de oligomerización de la toxina Cry1Ac en VMMA de la línea resistente NO-QAGE resulta en una disminución de la unión irreversible de esta toxina (datos no mostrados). La reducción en la unión irreversible puede deberse a la baja eficiencia de oligomerización; ya que el oligómero es la entidad molecular que se inserta en la membrana, o a defectos en la inserción de los oligómeros formados. Se ha propuesto que el transportador ABCC2 funciona como una molécula receptora que une a la estructura oligomérica y facilita su inserción en la membrana (Heckel, 2012). Para determinar si el transportador ABCC2 también participa en este paso del mecanismo de acción, analizamos la asociación de oligómeros preformados en solución de la toxina

Cry1Ac, a las VMMA de la línea resistente NO-QAGE y la línea susceptible Geneva 88. Cuando las muestras de oligómeros preformados en solución no fueron diluidas y se incubaron con las VMMA de la línea resistente NO-QAGE y la línea susceptible Geneva 88, observamos una cantidad similar de oligómeros de la toxina Cry1Ac asociados a las VMMA de ambas poblaciones de *P. xylostella*. En contraste, cuando analizamos la asociación de los oligómeros preformados de la toxina Cry1Ac realizando diluciones seriadas (condiciones no-saturadas), la cantidad de oligómeros preformados asociados a las VMMA fue menor en la línea resistente NO-QAGE en comparación con la línea susceptible Geneva 88, no obstante la inserción en membrana no se abate por completo (Figura 16). Este resultado indica que el transportador ABCC2 se involucra parcialmente en facilitar la inserción del oligómero en la membrana. Es posible que otras proteínas asociadas a membrana como APN o ALP puedan favorecer la inserción del oligómero en la membrana, explicando el efecto parcial de la mutación en el transportador ABCC2 en la asociación del oligómero de la toxina Cry1Ac a las VMMA de la línea NO-QAGE. Estudios previos sugieren que la unión de las toxinas Cry1A a APN o ALP facilita la inserción en membrana en *M. sexta* (Arenas et al., 2010; Pardo-López et al., 2006).

Los resultados que obtuvimos con la población resistente NO-QAGE de *P. xylostella* (mutante en ABCC2) mostraron un fenotipo muy similar a los que obtuvimos con la población resistente AZP-R de *P. gossypiella* (mutante en cadherina), en ambas poblaciones la oligomerización es menos eficiente respecto a sus respectivas líneas susceptibles. Esto sugiere que tanto el transportador ABCC2 como la cadherina tienen un papel similar en el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ac promoviendo su oligomerización en distintas especies de insectos. Adicionalmente nuestros datos apoyan que el transportador ABCC2 no sólo se involucra en facilitar la oligomerización de la toxina Cry1Ac, también se involucra en la inserción del oligómero en la membrana. Los resultados están en acuerdo con el hecho de que la toxina Cry1AcMod es capaz de superar la resistencia a la toxina Cry1Ac en la línea NO-QAGE mutante en ABCC2 ya que esta toxina modificada es capaz de formar oligómeros en solución sin establecer interacción con su receptor (Soberón et al., 2007; Tabashnik et al., 2011). Es

interesante notar que a pesar de que en la línea resistente NO-QAGE de *P. xylostella* la eficiencia de oligomerización es menor que en la línea susceptible, la oligomerización no es abolida por completo, sugiriendo que existen otras moléculas que pueden promover este paso del mecanismo de acción. En la literatura se ha descrito una población de *P. xylostella* en la cual una cadherina es responsable de conferir susceptibilidad a la toxina Cry1Ac, al silenciar el gen de esta proteína de membrana se obtiene un fenotipo de tolerancia frente al reto con la toxina Cry1Ac, no obstante esta población fue aislada en el campo en Corea y no se encuentra relacionada a la población susceptible Geneva 88 caracterizada en este estudio ( Park et al., 2015). Es posible que dentro de la misma subespecie de lepidópteros las variaciones genéticas puedan favorecer la selección de distintas moléculas de membrana como receptores de toxinas Cry. En *S. frugiperda* se reportaron tres poblaciones aisladas en Brasil, Colombia y México que presentan un perfil de susceptibilidad diferente frente al reto con las toxinas Cry1B, Cry1C y Cry1D y esto correlaciona con diferencias a nivel genético entre las poblaciones a pesar de pertenecer a la misma subespecie (Monnerat et al., 2006). En consecuencia, el transportador ABCC2 así como la cadherina podrían ser capaces de promover la oligomerización en *P. xylostella*, sin embargo dependiendo de la población analizada uno de los receptores puede tener un papel preponderante al ser comparado con el otro. Interesantemente en *B. mori* se ha demostrado que la toxina Cry1Aa une a la cadherina y al transportador ABCC2 a través de la misma región: las asas del dominio II, apoyando la hipótesis de que ambas moléculas pueden cumplir con el mismo papel en el modo de acción en las toxinas Cry1A (Tanaka et al., 2016). Aún queda por determinar si la cadherina y el transportador ABCC2 funcionan en conjunto para promover la oligomerización eficiente de estas toxinas o si lo hacen de manera independiente. Por otra parte aún no es claro si se requiere de un transportador ABCC2 funcional para que este pueda promover la oligomerización y la inserción en membrana de manera eficiente, ya que de las mutaciones reportadas en la literatura, algunas ocurren en los dominios de unión a nucleótido (Park et al., 2014; Xiao et al., 2014) afectando directamente la función de transporte de esta molécula de membrana, mientras que otras mutaciones ocurren en segmentos transmembranales (Baxter et al., 2011), o en las asas que unen a los segmentos transmembranales y que se

encuentran expuestas al medio extracelular (Atsumi et al., 2012), además de mutaciones que dan lugar a proteína trunca (Gahan et al., 2010). Para resolver esta interrogante, se pueden generar mutantes del transportador ABCC2 en las cuales la función de hidrólisis de los dominios de unión a nucleótido se interrumpa al mutagenizar el sitio activo. Previamente se reportó una doble mutante en *H. virescens* que posee mutaciones en cadherina y en el transportador ABCC2 que muestra niveles de resistencia aditivos en comparación con poblaciones que contienen únicamente la mutación en cadherina o en el transportador ABCC2. Sin embargo en este insecto el transportador ABCC2 parece jugar un papel preponderante en la toxicidad ya que se observan mayores niveles de resistencia en esta población en comparación con la que posee únicamente la mutación en cadherina (Gahan et al., 2010). En el caso de *B. mori* se tiene evidencia adicional que apoya esta hipótesis, ya que la expresión heteróloga en células Sf9 del transportador ABCC2 confiere una mayor susceptibilidad a las toxinas Cry1A que la expresión del receptor cadherina (Tanaka et al., 2013). Esto podría explicarse con base en las observaciones realizadas en este estudio, ya que determinamos que el transportador ABCC2 se involucra en la oligomerización e inserción del oligómero en la membrana, en contraste la cadherina solo facilita la oligomerización de la toxina Cry1Ac, al involucrarse en dos pasos del mecanismo de acción la mutación en el transportador ABCC2 genera mayores niveles de resistencia. Otro dato interesante es que al co-expresar el transportador ABCC2 y la cadherina de *B. mori* en la línea celular Sf9 se observó un efecto de sinergismo ya que estas células presentaron mayores niveles de susceptibilidad a las toxinas Cry1A en comparación a las células que solo expresaban un receptor (Tanaka et al., 2013). El mismo fenómeno se reportó al co-expresar el transportador ABCC2 y la cadherina (HevCALP) de *H. virescens* en células Sf9, la presencia de ambos receptores sinergiza la toxicidad de Cry1Ac (Bretschneider et al., 2016). Recientemente se demostró que la expresión del transportador ABCC2 de *B. mori* en oocitos de *Xenopus* es suficiente para inducir la formación de poro, sugiriendo que el transportador ABCC2 se involucra en la oligomerización de la toxina y la inserción en membrana, también se concluyó que la co-expresión con cadherina incrementó significativamente la formación de poro de la toxina Cry1Aa. Aunado a esto, se observó una cantidad similar de oligómeros de la

toxina Cry1Aa en los oocitos que expresan cadherina o el transportador ABCC2, indicando que ambas proteínas detonan la oligomerización de la toxina, no obstante sólo el transportador ABCC2 facilita la inserción en membrana y la formación de poro (Tanaka et al., 2016). Por otra parte se ha reportado que abatir la unión de la toxina Cry1Aa a la cadherina de *B. mori* sólo resulta en una ligera disminución de la toxicidad (You et al., 2008). En conjunto, los resultados que obtuvimos en este estudio y estudios previos apoyan la hipótesis de que en ciertas especies de insectos el transportador ABCC2 y la cadherina tengan una importancia diferencial para la oligomerización de las toxinas Cry1A (Figura 18). En el caso de ALP y APN se ha demostrado que juegan un papel diferencial en la toxicidad de las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac en *M. sexta* (Flores-Escobar et al., 2013). En este trabajo demostramos que el papel funcional del transportador ABCC2 del lepidóptero *P. xylostella*, es promover la oligomerización e inserción en membrana de la toxina Cry1Ac. Así mismo demostramos la correlación entre deficiencias en la oligomerización y la resistencia a la toxina Cry1Ac debido a mutaciones en cadherina y en el transportador ABCC2 en *P. gossypiella* y *P. xylostella* respectivamente.

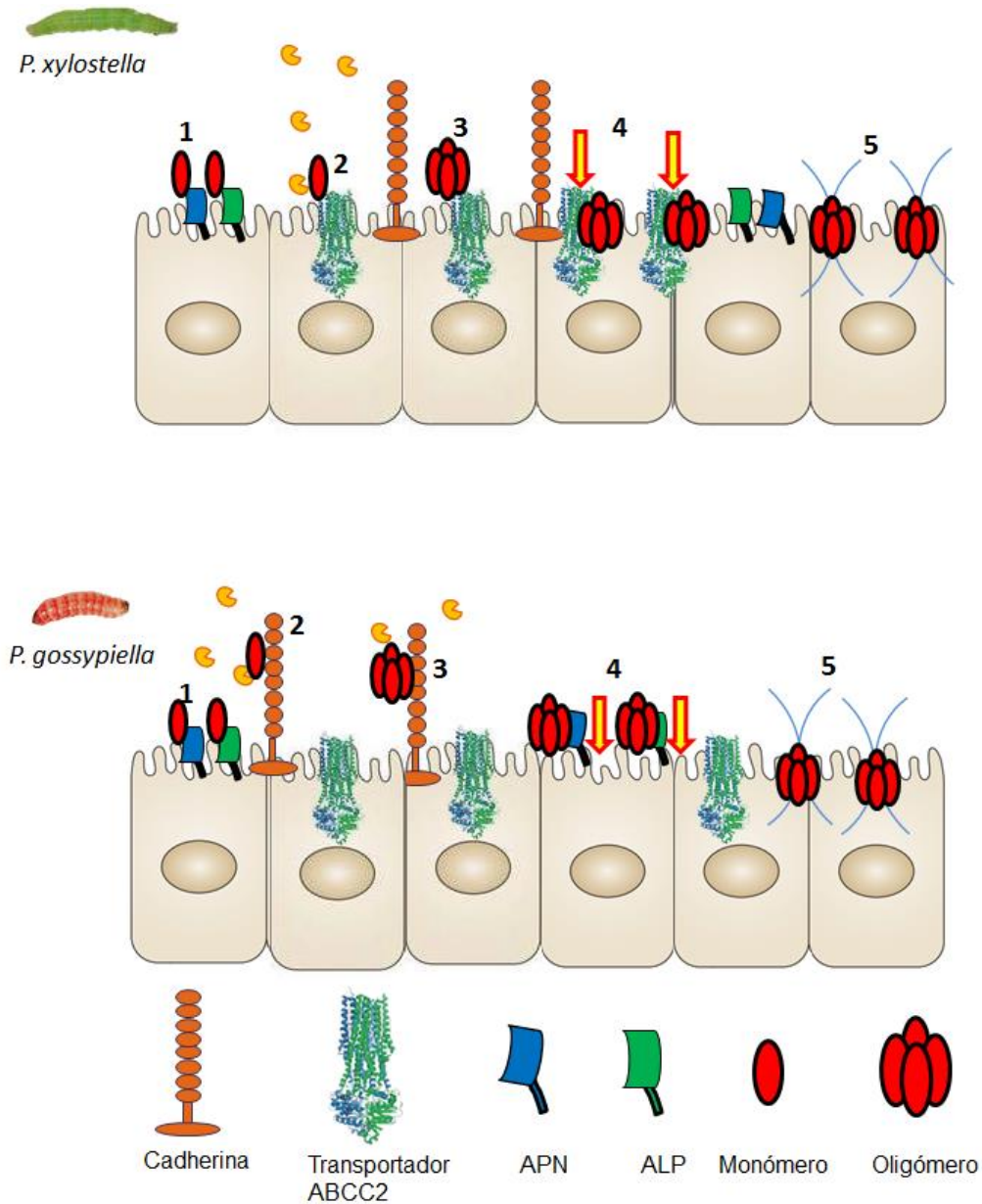


Figura 18. Papel diferencial de receptores que promueven oligomerización en el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ac en *P. xylostella* (arriba) y *P. gossypiella* (abajo). El mecanismo de acción es conservado ya que se comparten pasos en común, sin embargo la oligomerización depende de distintos receptores. 1) Localización sobre la membrana de la célula blanco. 2) Interacción con receptor que promueve la oligomerización eficiente de la toxina Cry1Ac (transportador ABCC2 en *P. xylostella* y cadherina en *P. gossypiella*). 3) Formación del complejo pre-poro oligomérico. 4) Interacción con receptor(es) que favorece la inserción en membrana. 5) Formación de poro y lisis celular.

## **Conclusiones:**

La toxina Cry1Ac se encuentra se encuentra afectada en la unión específica a las VMMA de la población resistente NO-QAGE de *P. xylostella*.

El transportador ABCC2 es necesario para promover la oligomerización eficiente de la toxina Cry1Ac en el lepidóptero *P. xylostella*.

El receptor cadherina es necesario para promover la oligomerización eficiente de la toxina Cry1Ac en *P. gossypiella*.

El transportador ABCC2 facilita la inserción del complejo pre-poro oligomérico en la membrana de las células de la microvellosidad en *P. xylostella*.

La toxina Cry1Ac modificada es capaz de superar la resistencia asociada a mutaciones en el transportador ABCC2 y a mutaciones en cadherina, debido a su capacidad de formar oligómeros en ausencia de receptor que se insertan en las membranas de las poblaciones resistentes AZPR de *P. gossypiella* y NO-QAGE de *P. xylostella*.

## **Perspectivas:**

Expresar el gen *abcc2* silvestre y mutante de *P. xylostella* en la línea celular Sf21 y evaluar mediante ensayos de citotoxicidad la susceptibilidad a las toxinas Cry1A y si esta correlaciona con la formación de oligómeros.

Analizar la oligomerización en otras líneas de insectos cuya resistencia se encuentra asociada al transportador ABCC2.

Determinar la región del transportador ABCC2 que establece interacción con la toxina Cry1Ac, y analizar si esta región es suficiente para promover la oligomerización de la toxina.

Analizar la oligomerización de la toxina Cry1Ac en las poblaciones resistentes de *H. virescens* que presentan mutaciones en el transportador ABCC2, en cadherina y la doble mutación ABCC2/cadherina.



## Literatura citada:

- Akoijam, R., R.S.Telem, & Marangmei, L. (2014). Insect pest problems and its changing trends on crop losses, 837–841. Retrieved from [http://www.researchgate.net/publication/259900124\\_Insect\\_pest\\_problems\\_and\\_its\\_changing\\_trends\\_on\\_crop\\_losses](http://www.researchgate.net/publication/259900124_Insect_pest_problems_and_its_changing_trends_on_crop_losses)
- Aller, S. G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., ... Chang, G. (2009). Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5922), 1718–22. <http://doi.org/10.1126/science.1168750>
- Angus, T. A. (1956). Association of toxicity with protein- crystalline inclusions of *Bacillus sotto* Ishiwata. *Can. J. Microbiol.*, 2, 122–131.
- Arenas, I., Bravo, A., Soberón, M., & Gómez, I. (2010). Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 285(17), 12497–12503. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.085266>
- Atsumi, S., Miyamoto, K., Yamamoto, K., Narukawa, J., Kawai, S., Sezutsu, H., ... Noda, H. (2012). Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(25), E1591-8. <http://doi.org/10.1073/pnas.1120698109>
- Baxter, S. W., Badenes-Pérez, F. R., Morrison, A., Vogel, H., Crickmore, N., Kain, W., ... Jiggins, C. D. (2011). Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* Toxin Resistance in Lepidoptera. *Genetics*, 189(2), 675–679. <http://doi.org/10.1534/genetics.111.130971>
- Baxter, S. W., Badenes-Pérez, F. R., Morrison, A., Vogel, H., Crickmore, N., Kain, W., ... Badenes-Perez, F. R. (2011). Parallel evolution of Bt toxin resistance in Lepidoptera. *Genetics*, 189(2), 675–9. <http://doi.org/10.1534/genetics.111.130971>

- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D. J., & Li, J. (2005). Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *Journal of Molecular Biology*, 348(2), 363–382. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.02.013>
- Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C., & Lescar, J. (2006). Structure of the Functional Form of the Mosquito Larvicidal Cry4Aa Toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Angstrom Resolution. *Structure*, 14(9), 3391–3401. <http://doi.org/10.1016/j.str.2006.08.013>
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Soberón, M. (2004). Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1667(1), 38–46. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.08.013>
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423–435. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>
- Bretschneider, A., Heckel, D. G., & Pauchet, Y. (2016). Three toxins, two receptors, one mechanism: Mode of action of Cry1A toxins from *Bacillus thuringiensis* in *Heliothis virescens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 76, 109–117. <http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.07.008>
- Chen, J., Aimanova, K. G., Fernandez, L. E., Bravo, A., Soberon, M., & Gill, S. S. (2009). *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *The Biochemical Journal*, 424(2), 191–200. <http://doi.org/10.1042/BJ20090730>
- Chen, J., Brown, M. R., Hua, G., & Adang, M. J. (2005). Comparison of the localization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A  $\delta$ -endotoxins and their binding proteins in larval midgut of tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Cell and Tissue Research*, 321(1), 123–129. <http://doi.org/10.1007/s00441-005-1124-6>

- Chen, J., Hua, G., Jurat-Fuentes, J. L., Abdullah, M. A., & Adang, M. J. (2007). Synergism of *Bacillus thuringiensis* toxins by a fragment of a toxin-binding cadherin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(35), 13901–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.0706011104>
- Chen, W., Liu, C., Xiao, Y., Zhang, D., Zhang, Y., Li, X., ... Wu, K. (2015). A toxin-binding alkaline phosphatase fragment synergizes Bt toxin Cry1Ac against susceptible and resistant *Helicoverpa armigera*. *PLoS ONE*, *10*(4), 1–19. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0126288>
- Chen, Z.-S., & Tiwari, A. K. (2011). Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases. *The FEBS Journal*, *278*(18), 3226–45. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08235.x>
- de Maagd, R. a, Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., & Schnepf, H. E. (2003). Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics*, *37*, 409–433. <http://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.143042>
- Dean, M., Hamon, Y., & Chimini, G. (2001). The Human ATP-Binding Cassette transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*, *42*, 1007–1017. <http://doi.org/10.1101/gr.184901.The>
- Devine, G. J., & Furlong, M. J. (2007). Insecticide use: Contexts and ecological consequences. *Agriculture and Human Values*, *24*(3), 281–306. <http://doi.org/10.1007/s10460-007-9067-z>
- Dorsch, J. A., Candas, M., Griko, N. B., Maaty, W. S. A., Midboe, E. G., Vadlamudi, R. K., & Bulla, L. A. (2002). Cry1A toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a region adjacent to the membrane-proximal extracellular domain of BT-R1 in *Manduca sexta*: Involvement of a cadherin in the-entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *32*(9), 1025–1036. [http://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00040-1](http://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00040-1)

- Eguchi, M. (1995). Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and*, 111(2), 151–162. [http://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)00248-S](http://doi.org/10.1016/0305-0491(94)00248-S)
- Fabrick, J., Oppert, C., Lorenzen, M. D., Morris, K., Oppert, B., & Jurat-Fuentes, J. L. (2009). A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 284(27), 18401–18410. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.001651>
- Fernandez, L. E., Aimanova, K. G., Gill, S. S., Bravo, A., & Soberón, M. (2006). A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *The Biochemical Journal*, 394(Pt 1), 77–84. <http://doi.org/10.1042/BJ20051517>
- Ferré, J., Real, M. D., Van Rie, J., Jansens, S., & Peferoen, M. (1991). Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(12), 5119–5123. <http://doi.org/10.1073/pnas.88.12.5119>
- Ferré, J., & Van Rie, J. (2002). Biochemistry and Genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 47, 501–533. <http://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145234>
- Flannagan, R. D., Yu, C.-G., Mathis, J. P., Meyer, T. E., Shi, X., Siqueira, H. a a, & Siegfried, B. D. (2005). Identification, cloning and expression of a Cry1Ab cadherin receptor from European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(1), 33–40. <http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.10.001>
- Flores-Escobar, B., Rodríguez-Magadan, H., Bravo, A., Soberón, M., & Gómez, I. (2013). Differential role of *Manduca sexta* aminopeptidase-N and alkaline phosphatase in the mode of action of Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(15), 4543–4550.

<http://doi.org/10.1128/AEM.01062-13>

- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., & Soberón, M. (2002). 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 Letters*, 513(2–3), 242–246. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02321-9](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02321-9)
- Gahan, L. J., Gould, F., & Heckel, D. G. (2001). Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5531), 857–860. <http://doi.org/10.1126/science.1060949>
- Gahan, L. J., Pauchet, Y., Vogel, H., & Heckel, D. G. (2010). An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *PLoS Genetics*, 6(12), 1–11. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001248>
- Galitsky, N., & Cody, V. (2005). research papers Structure of the insecticidal bacterial  $\delta$ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis* research papers, (2001), 1101–1109.
- Gill, M., & Ellar, D. (2002). Transgenic *Drosophila* reveals a functional in vivo receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. *Insect Molecular Biology*, 11(6), 619–625. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2002.00373.x>
- Gómez, I., Arenas, I., Benitez, I., Miranda-Ríos, J., Becerril, B., Grande, R. Bravo A. Soberón, M. (2006). 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*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(45), 34032–34039. <http://doi.org/10.1074/jbc.M604721200>
- Gómez, I., Sánchez, J., Muñoz-Garay, C., Matus, V., Gill, S. S., Soberón, M., & Bravo, A. (2014). *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins are versatile proteins with multiple modes of action: two distinct pre-pores are involved in toxicity. *The Biochemical Journal*, 459, 383–96. <http://doi.org/10.1042/BJ20131408>
- González-Cabrera, J., Escruche, B., Tabashnik, B. E., & Ferré, J. (2003). Binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in resistant and susceptible strains of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(9), 929–

935. [http://doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00099-7](http://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00099-7)

González, J. M., Brown, B. J., & Carlton, B. C. (1982). Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(22), 6951–6955. <http://doi.org/10.1073/pnas.79.22.6951>

Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.-L., Brousseau, R., & Cygler, M. (1995). *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) Insecticidal Toxin: Crystal Structure and Channel Formation. *Journal of Molecular Biology*, 254(3), 447–464. <http://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0630>

Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, 84(3), 345–357. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81279-9](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81279-9)

Gunning, R. V., Dang, H. T., Kemp, F. C., Ian, C., Moores, G. D., & Nicholson, I. C. (2005). New Resistance Mechanism in *Helicoverpa armigera* Threatens Transgenic Crops Expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2558–2563. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2558>

Guo, S., Ye, S., Liu, Y., Wei, L., Xue, J., Wu, H., ... Rao, Z. (2009). Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *Journal of Structural Biology*, 168(2), 259–266. <http://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.07.004>

Guo, Z., Kang, S., Chen, D., Wu, Q., Wang, S., Xie, W., ... Zhang, Y. (2015). MAPK signaling pathway alters expression of midgut ALP and ABCC genes and causes resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in diamondback moth. *PLoS genetics* (Vol. 11). <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005124>

Guo, Z., Kang, S., Zhu, X., Xia, J., Wu, Q., Wang, S., ... Zhang, Y. (2015). Down-regulation of a novel ABC transporter gene (Pxwhite) is associated with Cry1Ac resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 59, 30–40. <http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.01.009>

- Heckel, D. G. (2012). Learning the ABCs of Bt: ABC transporters and insect resistance to *Bacillus thuringiensis* provide clues to a crucial step in toxin mode of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *104*(2), 103–110. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.05.007>
- Hernández-Martínez, P., Navarro-Cerrillo, G., Caccia, S., de Maagd, R. A., Moar, W. J., Ferré, J., Herrero, S. (2010). Constitutive activation of the midgut response to *Bacillus thuringiensis* in Bt-resistant *Spodoptera exigua*. *PLoS ONE*, *5*(9), 1–10. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0012795>
- Herrero, S., Gechev, T., Bakker, P. L., Moar, W. J., & de Maagd, R. a. (2005). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. *BMC Genomics*, *6*(i), 96. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-6-96>
- Herrero, S., González-Cabrera, J., Ferré, J., Bakker, P. L., & de Maagd, R. a. (2004). Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. *The Biochemical Journal*, *384*(Pt 3), 507–513. <http://doi.org/10.1042/BJ20041094>
- Hua, G., Jurat-Fuentes, J. L., & Adang, M. J. (2004). Fluorescent-based assays establish *Manduca sexta* Bt-R1 cadherin as a receptor for multiple *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins in *Drosophila* S2 cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *34*(3), 193–202. <http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.10.006>
- Hua, G., Zhang, R., Abdullah, M. A. F., & Adang, M. J. (2008). *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis* israelensis and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. *Biochemistry*, *47*(18), 5101–5110. <http://doi.org/10.1021/bi7023578>
- Hui, F., Scheib, U., Hu, Y., Sommer, R. J., Aroian, R. V., & Ghosh, P. (2012). Structure and glycolipid binding properties of the nematocidal protein Cry5B. *Biochemistry*, *51*(49), 9911–9921. <http://doi.org/10.1021/bi301386q>

- Jiménez-Juárez, N., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Saab-Rincon, G., Damian-Almazo, J. Y., Gill, S. S., Soberón M., Bravo, A. (2007). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. *Journal of Biological Chemistry*, 282(29), 21222–21229.  
<http://doi.org/10.1074/jbc.M701314200>
- Jurat-Fuentes, J. L., & Adang, M. J. (2006). The *Heliothis virescens* cadherin protein expressed in *Drosophila* S2 cells functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A but not Cry1Fa toxins. *Biochemistry*, 45(32), 9688–9695.  
<http://doi.org/10.1021/bi0606703>
- Jurat-Fuentes, J. L., Gahan, L. J., Gould, F. L., Heckel, D. G., & Adang, M. J. (2004). The HevCaLP protein mediates binding specificity of the Cry1A class of *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Biochemistry*, 43(44), 14299–14305.  
<http://doi.org/10.1021/bi048500i>
- Jurat-Fuentes, J. L., Karumbaiah, L., Jakka, S. R. K., Ning, C., Liu, C., Wu, K., ... Adang, M. (2011). Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS ONE*, 6(3), 1–8. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0017606>
- Keller, M., Sneh, B., Strizhov, N., Prudovsky, E., Regev, A., Koncz, C., ... Zilberstein, A. (1996). Digestion of  $\delta$ -Endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIc. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26(4), 365–373. [http://doi.org/10.1016/0965-1748\(95\)00102-6](http://doi.org/10.1016/0965-1748(95)00102-6)
- Khajuria, C., Buschman, L. L., Chen, M. S., Siegfried, B. D., & Zhu, K. Y. (2011). Identification of a novel aminopeptidase P-like gene (OnAPP) possibly involved in Bt toxicity and resistance in a major corn pest (*Ostrinia nubilalis*). *PLoS ONE*, 6(8).  
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0023983>
- Knight, P. J. K., Crickmore, N., & Ellar, D. J. (1994). The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Molecular Microbiology*, 11(3),



429–436. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00324.x>

- Labbé, R., Caveney, S., & Donly, C. (2011). Genetic analysis of the xenobiotic resistance-associated ABC gene subfamilies of the Lepidoptera. *Insect Molecular Biology*, 20(2), 243–256. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01064.x>
- Li, H., Oppert, B., Higgins, R. A., Huang, F., Zhu, K. Y., & Buschman, L. L. (2004). Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(8), 753–762. <http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.010>
- Li, J. D., Carroll, J., & Ellar, D. J. (1991). Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, 353(6347), 815–21. <http://doi.org/10.1038/353815a0>
- LI, Y. ping, WU, J. xiang, LIU, C. xi, YUAN, X. qun, WU, K. ming, LIANG, G. mei, & GUO, Y. yuan. (2012). Comparative Analysis of CryIAc Toxin Oligomerization and Pore Formation Between Bt-Susceptible and Bt-Resistant *Helicoverpa armigera* Larvae. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(11), 1845–1851. [http://doi.org/10.1016/S2095-3119\(12\)60189-0](http://doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60189-0)
- Liu, Y. B., Tabashnik, B. E., Dennehy, T. J., Patin, A. L., Sims, M. A., Meyer, S. K., & Carriere, Y. (2001). Effects of Bt cotton and Cry1Ac toxin on survival and development of pink bollworm (Lepidoptera : Gelechiidae). *Journal of Economic Entomology*, 94, 1237–1242 ST–Effects of Bt cotton and Cry1Ac to. <http://doi.org/10.1603/0022-0493-94.5.1237>
- Ma, G., Rahman, M. M., Grant, W., Schmidt, O., & Asgari, S. (2012). Insect tolerance to the crystal toxins Cry1Ac and Cry2Ab is mediated by the binding of monomeric toxin to lipophorin glycolipids causing oligomerization and sequestration reactions. *Developmental and Comparative Immunology*, 37(1), 184–192. <http://doi.org/10.1016/j.dci.2011.08.017>

- McNall, R. J., & Adang, M. J. (2003). Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(10), 999–1010.  
[http://doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00114-0](http://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00114-0)
- Melo, A. L. de A., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2016). *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 317–26. <http://doi.org/10.3109/07388551.2014.960793>
- Meng, J., Candas, M., Keeton, T. P., & Bulla, L. a. (2001). Expression in *Spodoptera frugiperda* (Sf21) insect cells of BT-R(1), a cadherin-related receptor from *Manduca sexta* for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Protein Expression and Purification*, 22(1), 141–7. <http://doi.org/10.1006/prev.2001.1421>
- Monnerat, R., Martins, E., Queiroz, P., Ordu, S., Jaramillo, G., Benintende, G., ... Gene, E. R. (2006). Genetic Variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera : Noctuidae) Populations from Latin America Is Associated with Variations in Susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry Toxins. 72(11), 7029–7035.  
<http://doi.org/10.1128/AEM.01454-06>
- Morin, S., Biggs, R. W., Sisterson, M. S., Shriver, L., Ellers-Kirk, C., Higginson, D., ... Tabashnik, B. E. (2003). Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5004–9.  
<http://doi.org/10.1073/pnas.0831036100>
- Morse, R. J., Yamamoto, T., & Stroud, R. M. (2001). Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure*, 9(5), 409–417.  
[http://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00601-3](http://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00601-3)
- Nagamatsu, Y., Koike, T., Sasaki, K., Yoshimoto, A., & Furukawa, Y. (1999). The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin. *FEBS Letters*, 460(2), 385–390.  
[http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01327-7](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01327-7)

- Nakanishi, K., Yaoi, K., Nagino, Y., Hara, H., Kitami, M., Atsumi, S., ... Sato, R. (2002). Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella* their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin. *FEBS Letters*, 519(1), 215–220.
- Nicholson, G. M. (2007). Fighting the global pest problem: Preface to the special Toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon*, 49(4), 413–422. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.028>
- Oppert, B., Kramer, K. J., Beeman, R. W., Johnson, D., & McGaughey, W. H. (1997). Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J Biol Chem*, 272(38), 23473–23476.
- Pacheco, S., Gómez, I., Arenas, I., Saab-Rincon, G., Rodríguez-Almazán, C., Gill, S. S., Bravo A., Soberón, M. (2009). Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a “Ping Pong” binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 284(47), 32750–32757. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.024968>
- Pacheco, S., Gómez, I., Gill, S. S., Bravo, A., & Soberón, M. (2009). Enhancement of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins by fragments of a toxin-binding cadherin correlates with oligomer formation. *Peptides*, 30(3), 583–588. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.08.006>
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., Caballero, P., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6(12), 3296–3325. <http://doi.org/10.3390/toxins6123296>
- Pardo-López, L., Gómez, I., Rausell, C., Sánchez, J., Soberón, M., & Bravo, A. (2006). Structural Changes of the Cry1Ac Oligomeric Pre-Pore from *Bacillus thuringiensis* Induced by *N*-Acetylgalactosamine Facilitates Toxin Membrane Insertion<sup>†</sup>. *Biochemistry*, 45(34), 10329–10336. <http://doi.org/10.1021/bi060297z>

- Pardo-López, L., Soberón, M., & Bravo, A. (2013). *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(1), 3–22.  
<http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x>
- Park, Y., González-Martínez, R. M., Navarro-Cerrillo, G., Chakroun, M., Kim, Y., Ziarsolo, P., Herrero, S. (2014). ABCC transporters mediate insect resistance to multiple Bt toxins revealed by bulk segregant analysis. *BMC Biology*, 12, 46.  
<http://doi.org/10.1186/1741-7007-12-46>
- Park, Y., Herrero, S., & Kim, Y. (2015). A single type of cadherin is involved in *Bacillus thuringiensis* toxicity in *Plutella xylostella*. *Insect Molecular Biology*, 24(6), 624–633.  
<http://doi.org/10.1111/imb.12188>
- Payen, L., Sparfel, L., Courtois, A., Vernhet, L., Guillouzo, A., & Fardel, O. (2002). The drug efflux pump MRP2: Regulation of expression in physiopathological situations and by endogenous and exogenous compounds. *Cell Biology and Toxicology*, 18(4), 221–233. <http://doi.org/10.1023/A:1016020626941>
- Peng, D., Xu, X., Ye, W., Yu, Z., & Sun, M. (2010). *Helicoverpa armigera* cadherin fragment enhances Cry1Ac insecticidal activity by facilitating toxin-oligomer formation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 1033–1040.  
<http://doi.org/10.1007/s00253-009-2142-1>
- Pigott, C. R., & Ellar, D. J. (2007). Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 71(2), 255–81.  
<http://doi.org/10.1128/MMBR.00034-06>
- Rahman, M. M., Roberts, H. L. S., Sarjan, M., Asgari, S., & Schmidt, O. (2004). Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephesia kuehniella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 2696. <http://doi.org/10.1073/pnas.0306669101>

- Rajagopal, R., Sivakumar, S., Agrawal, N., Malhotra, P., & Bhatnagar, R. K. (2002). Silencing of midgut aminopeptidase N of K by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 46849–46851. <http://doi.org/10.1074/jbc.C200523200>
- R Rajagopal, S. S. (2003). *Helicoverpa armigera* ( American cotton bollworm ) midgut display differential interaction with closely related *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. *Biochemical Journal*, 978(370), 971–978. <http://doi.org/10.1042/BJ20021741> [doi]\rBJ20021741 [pii]
- Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., & Crickmore, N. (2010). *Bacillus thuringiensis*: An impotent pathogen? *Trends in Microbiology*, 18(5), 189–194. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2010.02.006>
- Shelton, Am, Robertson, JI, Tang, & Jd. (1993). Resistance of Diamondback Moth (Lepidoptera, *Plutellidae*) to *Bacillus thuringiensis* Subspecies in the Field, 86(3), 697–705. Retrieved from [http://apps.isiknowledge.com/full\\_record.do?product=WOS&search\\_mode=Refine&qid=5&SID=Y2gCe533ePk2PgH1jl&page=31&doc=1522](http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=Refine&qid=5&SID=Y2gCe533ePk2PgH1jl&page=31&doc=1522)
- Soberón, M., Pardo-López, L., López, I., Gómez, I., Tabashnik, B. E., & Bravo, A. (2007). Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science (New York, N. Y.)*, 318(5856), 1640–1642. <http://doi.org/10.1126/science.1146453>
- Tabashnik, B. E., Huang, F., Ghimire, M. N., Leonard, B. R., Siegfried, B. D., Rangasamy, M., ... Soberón, M. (2011). Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance. *Nature Biotechnology*, 29(12), 1128–1131. <http://doi.org/10.1038/nbt.1988>
- Tabashnik, B. E., Johnson, K. W., Engleman, J. T., Baum, J. A., Engelman, J. T., & Baum, J. A. (2000). Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ja in a strain of diamondback moth adapted to artificial diet. *Journal of Invertebrate Pathology*, 76(1), 81–83. <http://doi.org/10.1006/jipa.2000.4941>

- Tabashnik, B. E., Patin, a L., Dennehy, T. J., Liu, Y. B., Carrière, Y., Sims, M. a, & Antilla, L. (2000). Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(24), 12980–12984. <http://doi.org/10.1073/pnas.97.24.12980>
- Tanaka, S., Endo, H., Adegawa, S., Kikuta, S., & Sato, R. (2016). Functional characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry toxin receptors explain resistance in insects. *The FEBS Journal*, 1–17. <http://doi.org/10.1111/febs.13952>
- Tanaka, S., Miyamoto, K., Noda, H., Endo, H., Kikuta, S., & Sato, R. (2016). Single amino acid insertions in extracellular loop 2 of *Bombyx mori* ABCC2 disrupt its receptor function for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and Cry1Ac but not Cry1Aa toxins. *Peptides*, *78*, 99–108. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.01.006>
- Tanaka, S., Miyamoto, K., Noda, H., Jurat-Fuentes, J. L., Yoshizawa, Y., Endo, H., & Sato, R. (2013). The ATP-binding cassette transporter subfamily C member 2 in *Bombyx mori* larvae is a functional receptor for Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *FEBS Journal*, *280*(8), 1782–1794. <http://doi.org/10.1111/febs.12200>
- Tiewsiri, K., & Wang, P. (2011). Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(34), 14037–14042. <http://doi.org/10.1073/pnas.1102555108>
- Vachon, V., Laprade, R., & Schwartz, J. L. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*, *111*(1), 1–12. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2012.05.001>
- Vadlamudi, R. K., Ji, T. H., & Bulla, L. A. (1993). A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. berliner. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(17), 12334–12340.

- Wang, P., Zhang, X., & Zhang, J. (2005). Molecular characterization of four midgut aminopeptidase N isozymes from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(6), 611–620.  
<http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.02.002>
- Wang, P., Zhao, J. Z., Rodrigo-Sim??n, A., Kain, W., Janmaat, A. F., Shelton, A. M., ... Myers, J. (2007). Mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a greenhouse population of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), 1199–1207. <http://doi.org/10.1128/AEM.01834-06>
- Wheeler, W. (2002). Role of research and regulation in 50 years of pest management in agriculture. *J. Agric. Food Chem*, 50, 4151–4155.
- Xiao, Y., Zhang, T., Liu, C., Heckel, D. G., Li, X., Tabashnik, B. E., & Wu, K. (2014). Mis-splicing of the ABCC2 gene linked with Bt toxin resistance in *Helicoverpa armigera*. *Scientific Reports*, 4(Table 1), 6184. <http://doi.org/10.1038/srep06184>
- Xie, X., Cheng, T., Wang, G., Duan, J., Niu, W., & Xia, Q. (2012). Genome-wide analysis of the ATP-binding cassette (ABC) transporter gene family in the silkworm, *Bombyx mori*. *Molecular Biology Reports*, 39(7), 7281–7291.  
<http://doi.org/10.1007/s11033-012-1558-3>
- Xu, X., Yu, L., & Wu, Y. (2005). Disruption of a Cadherin Gene Associated with Resistance to Cry1Ac  $\delta$ -Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 948–954.  
<http://doi.org/10.1128/AEM.71.2.948>
- Yang, Y., Zhu, Y. C., Ottea, J., Husseneder, C., Rogers Leonard, B., Abel, C., & Huang, F. (2010). Molecular characterization and RNA interference of three midgut aminopeptidase N isozymes from *Bacillus thuringiensis* susceptible and resistant strains of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(8), 592–603. <http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.05.006>

- You, T. H., Lee, M. K., Jenkins, J. L., Alzate, O., & Dean, D. H. (2008). Blocking binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa to *Bombyx mori* cadherin receptor results in only a minor reduction of toxicity. *BMC Biochemistry*, 9, 3. <http://doi.org/10.1186/1471-2091-9-3>
- Zavala, L. E., Pardo-López, L., Cantón, P. E., Gómez, I., Soberón, M., & Bravo, A. (2011). Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin remain exposed to the solvent after insertion of part of domain I into the membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 286(21), 19109–19117. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.202994>
- Zhang, S., Cheng, H., Gao, Y., Wang, G., Liang, G., & Wu, K. (2009). Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(7), 421–429. <http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.04.003>
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Rose-Young, L., & Bulla, L. a. (2005). Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death and Differentiation*, 12(11), 1407–1416. <http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401675>
- Zhou, Z., Wang, Z., Liu, Y., Liang, G., Shu, C., Song, F., ... Zhang, J. (2016). Identification of ABCC2 as a binding protein of Cry1Ac on brush border membrane vesicles from *Helicoverpa armigera* by an improved pull-down assay. *MicrobiologyOpen*, n/a-n/a. <http://doi.org/10.1002/mbo3.360>



## ANEXO I: Publicaciones derivadas de este trabajo

ABCC2 is associated with *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin oligomerization and membrane insertion in diamondback moth

Josue Ocelotl<sup>1</sup>, Jorge Sánchez<sup>1</sup>, Isabel Gómez<sup>1</sup>, Bruce E. Tabashnik<sup>2</sup>, Alejandra Bravo<sup>1</sup> and Mario Soberón<sup>1\*</sup>

1 Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62210, (Mexico); 2 Department of Entomology, University of Arizona, Tucson, Arizona, (USA).

Address correspondence to: Mario Soberón Apdo postal 510-3, Cuernavaca 62250, Morelos, Mexico. 52 777 3291635 Fax: 52 777 3291624. E-mail: [mario@ibt.unam.mx](mailto:mario@ibt.unam.mx);

Cry1A insecticidal toxins bind sequentially to different larval gut proteins facilitating oligomerization, membrane insertion and pore formation. Cry1Ac interaction with cadherin triggers oligomerization. However, a mutation in an ABC transporter gene (ABCC2) was linked to Cry1Ac resistance in *Plutella xylostella*. Cry1AcMod, engineered to lack helix  $\alpha$ -1, was able to form oligomers without cadherin-binding and effectively countered Cry1Ac resistance linked to ABCC2. We analyzed Cry1Ac and Cry1AcMod binding and oligomerization by western blots using brush border membrane vesicles (BBMV) from *P. xylostella* susceptible (Geneva 88) and resistant (NO-QAGE) strain linked to an ABCC2 mutation. Resistance correlated with lack of specific binding and reduced oligomerization of Cry1Ac in BBMV from NO-QAGE. In contrast, Cry1AcMod bound specifically and still formed oligomers in BBMV from both strains. We compared association of pre-formed Cry1Ac oligomer, obtained by incubating Cry1Ac toxin with a *Manduca sexta* cadherin fragment, with BBMV from both strains. Our results show that pre-formed oligomers associate more efficiently with BBMV from the Geneva 88 than with BBMV from the NO-QAGE, indicating that ABCC2 mutation also affects the association of Cry1Ac-oligomer with the membrane. These data indicate, for the first time, that ABCC2 facilitates Cry1Ac oligomerization and oligomer membrane insertion in *P. xylostella*.

RESEARCH ARTICLE

# Binding and Oligomerization of Modified and Native Bt Toxins in Resistant and Susceptible Pink Bollworm

Josue Ocelotl<sup>1</sup>, Jorge Sánchez<sup>1</sup>, Raquel Arroyo<sup>1</sup>, Blanca I. García-Gómez<sup>1</sup>, Isabel Gómez<sup>1</sup>, Gopalan C. Unnithan<sup>2</sup>, Bruce E. Tabashnik<sup>2</sup>, Alejandra Bravo<sup>1\*</sup>, Mario Soberón<sup>1\*</sup>

**1** Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510–3, Cuernavaca, Mor. 62210, (Mexico), **2** Department of Entomology, University of Arizona, Tucson, Arizona, 85721, United States of America

\* [mario@ibt.unam.mx](mailto:mario@ibt.unam.mx) (MS); [bravo@ibt.unam.mx](mailto:bravo@ibt.unam.mx) (AB)



OPEN ACCESS

**Citation:** Ocelotl J, Sánchez J, Arroyo R, García-Gómez BI, Gómez I, Unnithan GC, et al. (2015) Binding and Oligomerization of Modified and Native Bt Toxins in Resistant and Susceptible Pink Bollworm. PLoS ONE 10(12): e0144086. doi:10.1371/journal.pone.0144086

**Editor:** Youjun Zhang, Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Science, CHINA

**Received:** August 10, 2015

**Accepted:** November 12, 2015

**Published:** December 3, 2015

**Copyright:** © 2015 Ocelotl et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología MX 179977; Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México IN205411-3; and United States Department of Agriculture, National Research Initiative 2008-03980. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* (Bt) are used extensively in sprays and transgenic crops for pest control, but their efficacy is reduced when pests evolve resistance. Better understanding of the mode of action of Bt toxins and the mechanisms of insect resistance is needed to enhance the durability of these important alternatives to conventional insecticides. Mode of action models agree that binding of Bt toxins to midgut proteins such as cadherin is essential for toxicity, but some details remain unresolved, such as the role of toxin oligomers. In this study, we evaluated how Bt toxin Cry1Ac and its genetically engineered counterpart Cry1AcMod interact with brush border membrane vesicles (BBMV) from resistant and susceptible larvae of *Pectinophora gossypiella* (pink bollworm), a global pest of cotton. Compared with Cry1Ac, Cry1AcMod lacks 56 amino acids at the amino-terminus including helix  $\alpha$ -1; previous work showed that Cry1AcMod formed oligomers *in vitro* without cadherin and killed *P. gossypiella* larvae harboring cadherin mutations linked with >1000-fold resistance to Cry1Ac. Here we found that resistance to Cry1Ac was associated with reduced oligomer formation and insertion. In contrast, Cry1AcMod formed oligomers in BBMV from resistant larvae. These results confirm the role of cadherin in oligomerization of Cry1Ac in susceptible larvae and imply that forming oligomers without cadherin promotes toxicity of Cry1AcMod against resistant *P. gossypiella* larvae that have cadherin mutations.

## Introduction

The widespread bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt) produces insecticidal crystalline (Cry) proteins that have been used in sprays for pest control for more than 50 years [1]. In addition, transgenic crops that produce Bt proteins to kill pests were first commercialized 20 years ago and were planted on 78 million hectares worldwide in 2014 [2, 3]. Cry toxins are effective against their target insect pests, but are not toxic to plants, vertebrates, or most non-target invertebrates [2, 4, 5, 6]. The evolution of resistance in insect pests is the primary threat to the

**Competing Interests:** BT, MS, and AB are coauthors of a patent on modified Bt toxins, "Suppression of Resistance in Insects to *Bacillus thuringiensis* Cry Toxins, Using Toxins that do not Require the Cadherin Receptor" (patent numbers: CA2690188A1, CN101730712A, EP2184293A2, EP2184293A4, EP2184293B1, WO2008150150A2, WO2008150150A3). However, this does not alter the authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

**Abbreviations:** Cry, Crystal  $\delta$ -endotoxin; Bt, *Bacillus thuringiensis*; 3d-Cry, three-domain-Cry toxins; LC<sub>50</sub>, mean lethal concentration; BBMV, brush border membrane vesicles; ALP, alkaline phosphatase; APN, aminopeptidase-N.

long-term efficacy of Bt toxins. Resistance has evolved in the laboratory, and in the field where Bt toxins were used in sprays or transgenic crops [7, 8, 9, 10, 11, 12]. Reduced binding of Bt toxins to larval midgut membranes is the most common and most potent mechanism of resistance [13, 14].

Although models of the mode of action of Bt toxins differ in some ways, all agree that toxicity of Cry1A proteins requires ingestion, solubilization in the midgut, and binding to larval midgut proteins, such as alkaline phosphatase (ALP), aminopeptidase N (APN), and cadherin [15, 16, 17, 18]. In the pore formation model, binding of toxin leads to formation of non-selective pores in midgut cell membranes and cell lysis [15]. Alternatively, the signaling model proposes that binding of toxin to cadherin initiates a magnesium-dependent signaling pathway that kills cells [19]. Recent reviews conclude that experimental support is stronger for the pore formation model than the signaling model, yet some details of the pore formation model remain unresolved [20, 21].

According to a variant of the pore formation model called the sequential binding model, binding to cadherin facilitates proteolytic removal of helix  $\alpha$ -1 from the amino-terminus of Cry1A toxins, eventually triggering toxin oligomerization and irreversible binding caused by insertion of oligomers into cell membranes [16–18, 22, 23]. However, the importance of oligomerization has been questioned [20, 21]. All previous evidence showing an association between oligomerization and toxicity comes from testing susceptible insect strains [24, 25].

In this study, to better understand Bt mode of action and mechanisms of resistance, we evaluated how Bt toxin Cry1Ac and its genetically engineered counterpart Cry1AcMod interact with brush border membrane vesicles (BBMV) from resistant and susceptible larvae of *Pectinophora gossypiella* (pink bollworm), a global pest of cotton. Resistance to Cry1Ac is linked with mutations that disrupt a Cry1Ac-binding cadherin protein in three major lepidopteran pests, including *P. gossypiella* [26, 27, 28]. The AZP-R strain of *P. gossypiella* harbors three recessive cadherin mutations that confer >1000-fold resistance to Cry1Ac [27, 29–31]. However, AZP-R and some resistant strains of several other species remain relatively susceptible to the genetically modified toxins Cry1AbMod and Cry1AcMod [31, 32]. The Cry1AMod protoxins have a deletion of 56 amino acids at their amino-terminus including helix  $\alpha$ -1, and do not require cadherin to form toxin oligomers *in vitro* [31]. The role of cadherin in toxin oligomerization has been documented *in vitro* with toxin-binding cadherin fragments from susceptible larvae [23]. However, previous work has not determined if cadherin mutations in resistant insects interfere with oligomerization. Here we compared the resistant strain AZP-R with a susceptible strain in terms of cadherin expression, as well as binding and oligomerization of Cry1Ac and Cry1AcMod. The results imply that the absence of wild type cadherin in AZP-R blocks oligomerization of Cry1Ac, but not Cry1AcMod, confirming that oligomerization is a key step in the toxic pathway.

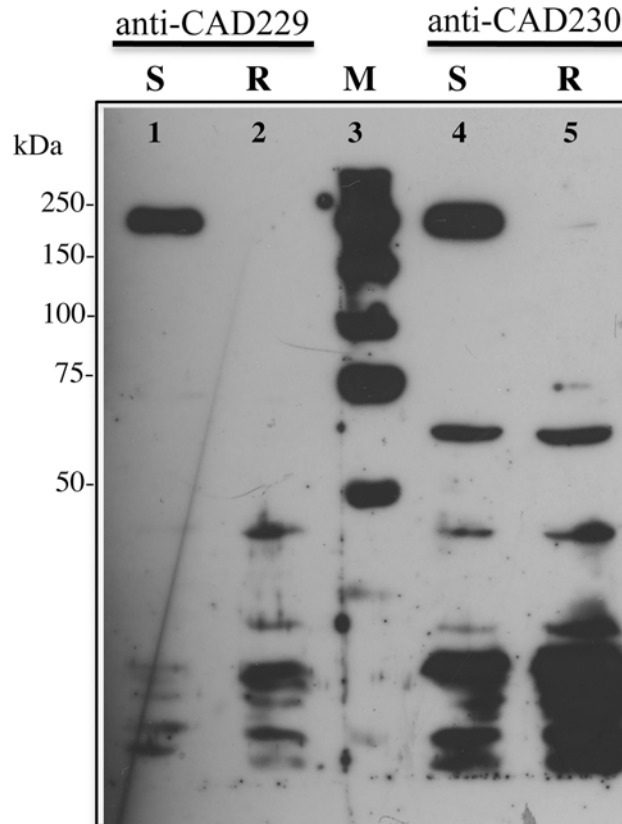
## Results

### Cadherin Expression

In western blots, both anti-cadherin antibodies detected cadherin (ca. 210 kDa) in BBMV from the susceptible APHIS strain, but not in BBMV from the resistant AZP-R strain (Fig 1). Both strains had bands of less than 70 kDa that may be cadherin degradation products (Fig 1).

### Specific Binding of Cry1Ac and Cry1AcMod to BBMV

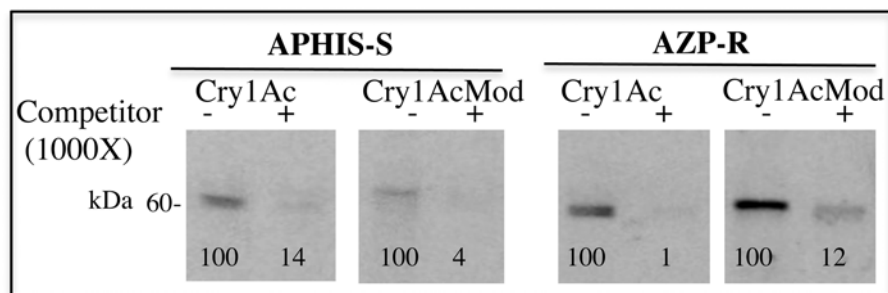
Specific binding of biotinylated trypsin-activated Cry1Ac and Cry1AcMod to BBMV was similar for APHIS-S and AZP-R (Fig 2). Homologous competition binding assays performed in the presence of 1000-fold excess of unlabeled toxin (unlabeled Cry1Ac added with labeled Cry1Ac



**Fig 1. Cadherin detection in resistant and susceptible strains of *Pectinophora gossypiella*.** BBMV from susceptible APHIS-S larvae (lanes 1 and 4) and resistant AZP-R larvae (lanes 2 and 5) were separated by SDS-PAGE. We detected cadherin using anti-cadherin antibodies anti-CAD229 (lanes 1 and 2) or anti-CAD230 (lanes 4 and 5). Lane 3 shows the biotinylated molecular weight markers.

doi:10.1371/journal.pone.0144086.g001

or unlabeled Cry1AcMod added with labeled Cry1AcMod) greatly diminished binding of labeled toxin, which indicates it was mostly specific binding (Fig 2).



**Fig 2. Specific binding of Cry1Ac and Cry1AcMod toxins to BBMV from resistant (AZP-R) and susceptible (APHIS-S) larvae of *P. gossypiella*.** The left lane of each pair shows total binding with no competitor (-). The right lane shows non-specific binding performed in the presence of 1000-fold excess of unlabeled competitor (Cry1Ac or Cry1AcMod, respectively) (+). The numbers under the bands with competitor (+) represent the optical density of the bands relative to the corresponding bands on the left without competitor (-) (set to 100). Total binding minus non-specific binding equals specific binding.

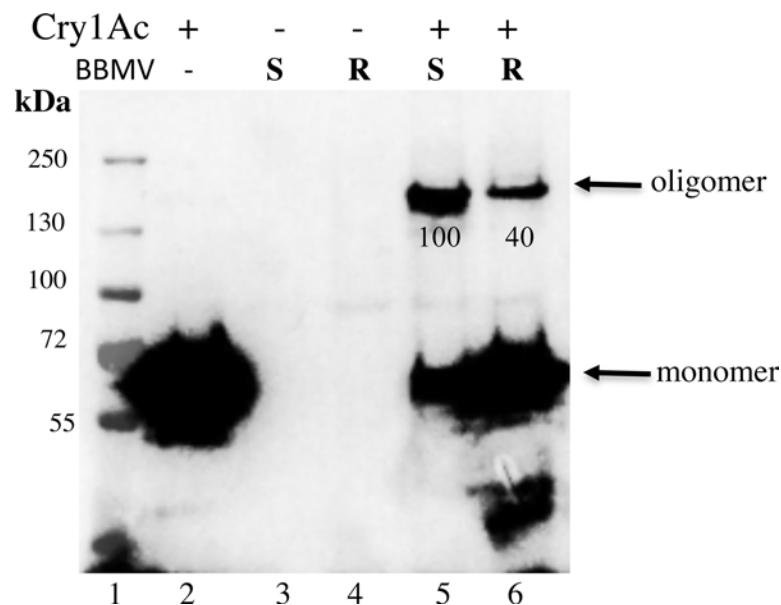
doi:10.1371/journal.pone.0144086.g002

### Oligomer Formation and Insertion

Oligomers were revealed by western blot using anti-Cry1Ac antibody by loading the samples in SDS-PAGE after heating the samples at 50°C for three min. We focused here on oligomer formation from Cry1Ac incubated with BBMV from resistant and susceptible larvae. We first analyzed oligomerization of Cry1Ac after incubation with BBMV without separation of BBMV by centrifugation. With the optical density of bands from Cry1Ac oligomers (ca. 200 kDa) in BBMV from APHIS-S standardized as 100%, the relative mean optical density of bands from AZP-R was 32% (range = 29 to 40%, paired t-test,  $t = 3.25$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.042$ , Fig 3 and S1 Table).

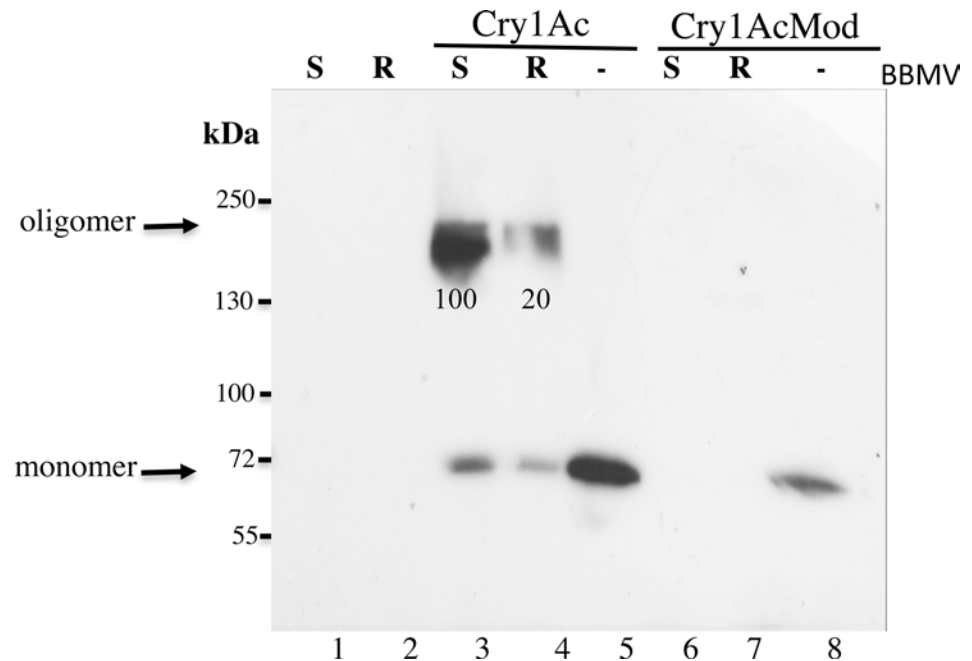
To analyze insertion of oligomers into the BBMV, we incubated 0.5 µg of activated Cry1Ac or activated Cry1AcMod with 15 µg of BBMV protein, then separated BBMV by centrifugation. With Cry1Ac, relative to BBMV from APHIS-S (standardized as 100%), mean oligomer formation in AZP-R was 22% (range = 9.0 to 30%, paired t-test,  $t = 15.5$ ,  $df = 4$ ,  $P = 0.0001$ , Fig 4A and S1 Table). With Cry1AcMod, we did not detect oligomers in either strain (Fig 4B).

Under the same conditions except a three-fold higher concentration (1.5 µg) of activated Cry1Ac, mean oligomer formation for AZP-R relative to APHIS-S was 30% (range = 19 to 46%, paired t-test,  $t = 7.5$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.018$ , Fig 5A and S1 Table). Under the same conditions but with a three-fold higher concentration (1.5 µg) of activated Cry1AcMod, oligomer formation did not differ significantly between AZP-R and APHIS-S (paired t-test,  $t = 1.56$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.26$ , Fig 5B and S1 Table). In some replicates we detected small amounts of monomers associated with BBMV (data not shown), which were probably dissembled oligomers because oligomers generated from activated toxin are highly temperature sensitive [23].



**Fig 3. Oligomerization of Cry1Ac in the presence of BBMV from resistant and susceptible larvae of *P. gossypiella*.** Cry1Ac activated toxin (0.5 µg) was incubated with BBMV (15 µg) from *P. gossypiella* susceptible APHIS-S (lane 5), resistant AZP-R (lane 6) separated by SDS-PAGE after three min heating at 50°C and revealed in western blot using anti-Cry1Ac antibody. Lane 1, shows MW markers; lane 2, Cry1Ac activated toxin; lane 3, BBMV from APHIS-S; lane 4, BBMV from AZP-R. Numbers under the 200 kDa bands represent the percentage of pixels relative to the 200 kDa band of APHIS-S BBMV with Cry1Ac toxin that corresponds to 100, calculated after scanning densitometry of the bands.

doi:10.1371/journal.pone.0144086.g003



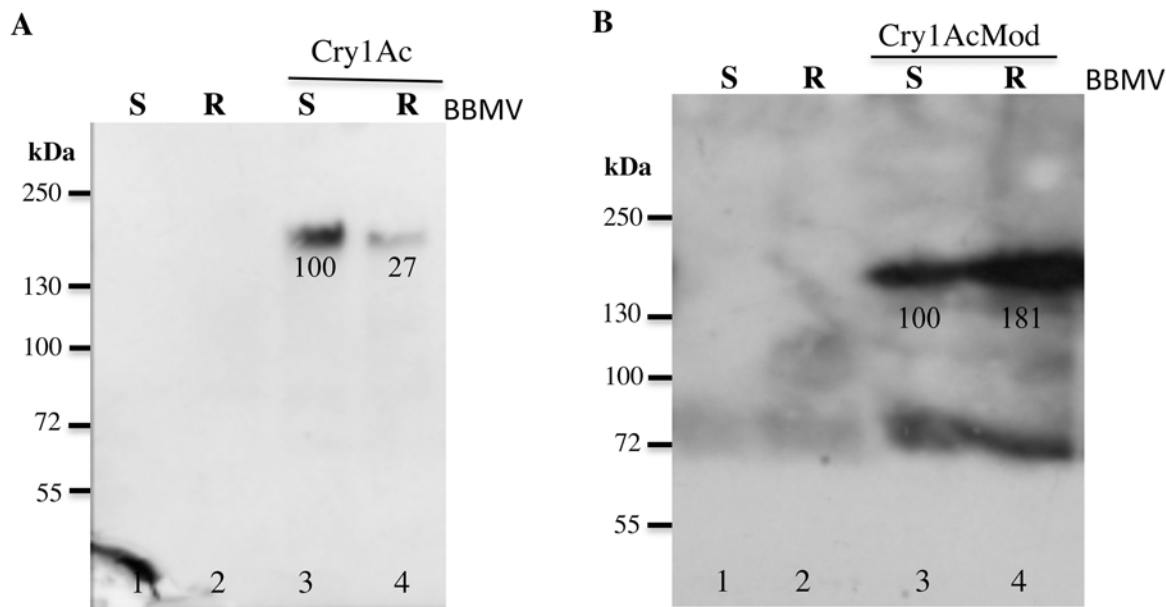
**Fig 4. Insertion of oligomers into BBMV from resistant and susceptible larvae of *P. gossypiella* with 0.5  $\mu$ g of Cry1Ac or Cry1AcMod.** Cry1Ac or Cry1AcMod activated toxins (0.5  $\mu$ g) were incubated with BBMV (15  $\mu$ g) from the different populations and the membrane pellets were recovered by centrifugation, separated by SDS-PAGE after three min heating at 50°C and revealed in western blot assays with anti-Cry1Ac antibody as described in Materials and Methods. Lanes 1 and 2 controls of BBMV without toxin from APHIS-S and AZP-R, respectively; lanes 5 and 8 are controls of soluble Cry1Ac and Cry1AcMod, respectively; lane 3, BBMV from APHIS-S precipitated after incubation with Cry1Ac; lane 4, BBMV from AZP-R precipitated after incubation with Cry1Ac; lane 6, BBMV from APHIS-S precipitated after incubation with Cry1AcMod; lane 7, BBMV from AZP-R precipitated after incubation with Cry1AcMod. Numbers under the 200 kDa bands represent the percentage of pixels relative to the 200 kDa band of APHIS-S BBMV with Cry1Ac toxin that corresponds to 100, calculated after scanning densitometry of the bands.

doi:10.1371/journal.pone.0144086.g004

## Discussion

[Table 1](#) summarizes the results of this study, including reduced oligomerization of Cry1Ac associated with resistance to Cry1Ac in the AZP-R strain of *P. gossypiella*. As far as we know, this is the first study showing an association between resistance and decreased toxin oligomerization. With one notable exception, previous studies of toxin oligomerization have focused on susceptible insects [24, 25]. In the exceptional case, oligomerization of Cry1Ac after incubation with BBMV did not differ between a resistant strain (LF120) and a susceptible strain (96S) of *Helicoverpa armigera* [33].

Consistent with previous results showing that resistance to Cry1Ac in AZP-R is tightly linked with deletion mutations disrupting a Cry1Ac-binding cadherin protein [27], the results here reveal reduced expression of full-length cadherin in AZP-R relative to a susceptible strain (Fig 1). By contrast, cadherin expression was similar in the LF120 and 96S strains of *H. armigera*, and the cadherin gene sequence differed between these strains by only single amino acid differences [33]. Moreover, the LF120 strain had reduced ALP activity and was derived from the LF60 strain, which harbors a mutation in ABC transporter protein ABCC2 linked with resistance to Cry1Ac [34, 35]. The comparison between the AZP-R strain of *P. gossypiella* and the LF120 strain of *H. armigera* suggests that the association between resistance and reduced oligomerization depends on the mechanism of resistance.



**Fig 5. Insertion of oligomers into BBMV from resistant and susceptible larvae of *P. gossypiella* with 1.5 µg of Cry1Ac or Cry1AcMod.** BBMVs (15 µg) from *P. gossypiella* were incubated with 1.5 µg of Cry1Ac (Panel A) or Cry1AcMod (Panel B), BBMVs were recovered by centrifugation and the membrane pellet was separated by SDS-PAGE after three min heating at 50°C and revealed in western blots using anti-Cry1Ac antibody as described in Materials and Methods. Panel A. lanes 1 and 2 are controls of BBMVs without toxin from APHIS-S and AZP-R; lane 3, BBMVs from APHIS-S precipitated after incubation with Cry1Ac; lane 4, BBMVs from AZP-R precipitated after incubation with Cry1Ac. Panel B. lanes 1 and 2 are controls of BBMVs without toxin from APHIS-S and AZP-R; lane 3, APHIS-S precipitated after incubation with Cry1AcMod; lane 4, AZP-R precipitated after incubation with Cry1AcMod. Numbers under the 200 kDa bands represent the percentage of pixels relative to the 200 kDa band of APHIS-S BBMVs with Cry1Ac toxin (A) or Cry1AcMod (B) that corresponds to 100, calculated after scanning densitometry of the bands.

doi:10.1371/journal.pone.0144086.g005

Consistent with previous results [36], we found that specific binding of Cry1Ac was similar between BBMVs from AZP-R and BBMVs from the susceptible strain APHIS-S (Fig 2). We hypothesize that these results reflect binding of Cry1Ac to midgut proteins in AZP-R other than cadherin, such as ALP and APN. Given the resistance of AZP-R to Cry1Ac [29, 31], we infer that this binding is not sufficient to confer susceptibility to Cry1Ac.

The fact that oligomerization was reduced in the AZP-R strain but not abolished probably suggests that other insect molecules could also facilitate Cry toxin oligomerization. Also, we did not exclude that the difference in oligomer amounts is due to slower oligomer formation rather than lower amounts being formed. This remains to be determined.

Two different models of oligomerization have been proposed. One of them proposed that oligomerization of Cry toxins follows after monomer insertion into the membrane in contrast to the second model that proposed the formation of a pre-pore oligomeric structure that is responsible for membrane insertion [20]. It is difficult to distinguish between both models. However, the fact that the amount of Cry1Ac monomer is absent or diminishes substantially

**Table 1. Summary of binding and oligomerization of Cry1Ac and Cry1AcMod incubated with BBMVs from susceptible and resistant *P. gossypiella*.**

Insect strain	Toxin					Toxicity [28]
APHIS-S	Cry1Ac	+	++	++	++	+++
AZP-R	Cry1Ac	+	+	+	+	-
APHIS-S	Cry1AcMod	+	NA <sup>a</sup>	-	++	++
AZP-R	Cry1AcMod	+	NA <sup>a</sup>	-	++	++

<sup>a</sup> NA, data not available; previous results show Cry1AcMod protoxin formed oligomers without BBMVs or cadherin [31].

doi:10.1371/journal.pone.0144086.t001

when BBMV were centrifuged and analyzed (Figs 4 and 5), compared with samples where BBMV were not separated by centrifugation (Fig 3) supports that pre-pore oligomers are responsible for membrane insertion. The small amounts of 60 kDa monomer band observed in some samples where BBMV were separated are likely due to disassembled oligomers after temperature treatment since we previously shown that oligomers from activated Cry1Ab monomers are highly sensitive to temperature [23].

The results here indicate that incubation with BBMV from AZP-R yielded oligomer insertion in tests with a high concentration (1.5  $\mu\text{g}$  toxin) of Cry1AcMod, but not Cry1Ac (Fig 5). These new data are consistent with previous findings that Cry1AcMod was much more potent than Cry1Ac against AZP-R [31, 37]. We conclude that the higher efficacy of Cry1AcMod against AZP-R is associated with the increased oligomer formation seen with Cry1AcMod relative to Cry1Ac. However, incubation of Cry1AcMod with BBMV from AZP-R or APHIS-S did not produce oligomer insertion in tests with a lower concentration of Cry1AcMod (0.5  $\mu\text{g}$  toxin) (Figs 2 and 4). In the case of Cry1AbMod, reduced toxicity was associated with reduced efficiency in activated toxin oligomerization [23]. These results could also be related to lower efficiency in oligomerization of Cry1AcMod from activated toxin.

Overall, the results here with Cry1Ac and Cry1AcMod support the conclusion that oligomerization is an important step in the mode of action of these toxins against *P. gossypiella*. In addition, the results confirm the role of cadherin in oligomerization of Cry1Ac, but not Cry1AcMod. The previous results from related work with *H. armigera* summarized above indicate that reduced oligomerization is not always associated with resistance [33]. More studies comparing oligomerization between resistant and susceptible strains would enable rigorous testing of the hypothesis that decreased oligomerization is associated with disruption of cadherin, but not other mechanisms of resistance.

## Materials and Methods

### Insect Strains

We analyzed the APHIS-S and AZP-R strains of *P. gossypiella*. APHIS-S is a susceptible strain that had been reared in the laboratory for more than 30 years without exposure to Bt toxins [38]. AZP-R is a Cry1Ac-resistant strain that was started by pooling survivors of exposure to Cry1Ac in diet from 10 populations derived in 1997 from Arizona cotton fields [29].

### Cry1Ac and Cry1AcMod Toxin Purification

Bt HD73 expressing Cry1Ac or Bt 407 expressing Cry1AcMod [31] were grown at 30°C until complete sporulation (3 to 4 days) in nutrient broth sporulation medium. In the case of the Bt strain producing Cry1AcMod the medium was supplemented with erythromycin at 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Spores/crystals were washed twice in 300 mM NaCl, 10 mM EDTA. Crystal inclusions were solubilized in an alkaline buffer (50 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol, pH 10.5) for 2 h at 37°C. Trypsin activated toxins were obtained by treatment of soluble protoxin with trypsin (TPCK treated trypsin from bovine pancreas, SIGMA Aldrich, St. Louis, MO) in a mass ratio of 1:50 (trypsin: toxin) for 2 h at 37°C after lowering the pH to 8.5 by adding 1:4 (w/w) of 1 M Tris buffer pH 8.5. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (1 mM final concentration) was added to stop proteolysis. Activated proteins were purified by anion exchange chromatography Mono Q-Sepharose fast flow (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) in an AKTA FPLC System (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), using a 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8.5 buffer, and a linear NaCl concentration gradient from 50 to 300 mM. Protein concentrations were determined by the method of Bradford, using bovine serum albumin as a standard.



## Midgut Brush Border Membrane Vesicles (BBMV) Purification

*P. gossypiella* midgut tissues from third instar larvae were dissected and stored immediately at  $-70^{\circ}\text{C}$ . BBMV were prepared by the magnesium precipitation method as described by Wolfersberger et al 1987 [39] and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until used. The BBMV protein concentrations were determined with the Lowry DC protein assay (BioRad, Hercules, CA) using bovine serum albumin as a standard.

## Binding of Cry1Ac and Cry1AcMod to BBMV

To determine the effect of cadherin mutations in *P. gossypiella* AZP-R on Cry1Ac and Cry1AcMod binding, we performed binding analysis of the activated toxins to BBMV. The crystal inclusions of Cry1Ac, and Cry1AcMod were solubilized, activated with trypsin and labeled with biotin. The total binding of biotinylated proteins after incubation with BBMV isolated from each susceptible and resistant insect was analyzed in absence of competitor. The non-specific binding was analyzed in homologous competition experiments after incubation of these toxins with the BBMV in the presence of 1000-fold excess of the corresponding unlabeled toxin. Trypsin activated monomeric toxins were labeled with biotinyl-*N*-hydroxy-succinimide ester according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences). Non-specific binding was determined by measuring binding of 5 nM labeled toxin in the presence of 1000-fold molar excess of unlabeled toxin after 100 min. Proteins were incubated at  $25^{\circ}\text{C}$  with 10  $\mu\text{g}$  BBMV protein in 100  $\mu\text{l}$  binding buffer (PBS, 0.1% BSA, 0.1% Tween 20, pH 7.6). After incubation the unbound toxin was removed by centrifugation for 10 min at 14,000  $\times g$ . The pellet containing BBMV and bound toxin was washed twice with 100  $\mu\text{l}$  binding buffer, suspended in 10  $\mu\text{l}$  of PBS pH 7.6, and 10  $\mu\text{l}$  sample loading buffer 2X (0.125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, and 0.01% bromophenol blue). Samples were boiled 3 min, loaded in 10% SDS-PAGE gels and electrotransferred to nitrocellulose membranes. Bound labeled toxin was identified by incubating with streptavidin-peroxidase conjugate (Millipore) (1:20000 dilution) for 1h, developing with luminol (Santa Cruz Biotechnology Inc.). The optical density of the 60 kDa bands was measured by using ImageJ program (<http://imagej.nih.gov/ij/>). All binding assays were performed in triplicate.

**Specific binding.** Binding assays of Cry1Ac or Cry1AcMod biotinylated toxins were performed as previously described [23]. Total binding was measured in binding assays after 100 min of incubating 10  $\mu\text{g}$  BBMV protein with 5 nM labeled toxin in 100  $\mu\text{l}$  binding buffer. For competition analysis 1000-fold excess of unlabeled toxin was added at the same time as labeled toxin. All assays were performed in triplicate. Numbers under the bands in Fig 2 represent the percentage of each band on the blot calculated after scanning optical density of the bands and using the 60 kDa band of the same size in the gel with the highest optical density as 100% reference.

## Identification of Cadherin Protein

Western blots were performed to identify cadherin protein. Cadherin in *P. gossypiella* was identified with two different antibodies raised against two fragments of cadherin from *P. gossypiella* the CR8-CR9 fragment (antibody 229) and CR8-CR11 fragment (antibody 230) [27]. BBMV protein (10  $\mu\text{g}$ ) from each insect were boiled 3 min in sample loading buffer, loaded into 10% SDS-PAGE and electrotransferred to a nitrocellulose membrane, blocked with skimmed milk (5%), detected with anti-cadherin polyclonal antibodies (1/30,000; 1 h) and visualized with a goat anti-rabbit antibody coupled with horseradish peroxidase (Sigma, St. Louis, MO) (1/5000; 1 h), followed by SuperSignal chemiluminescent substrate (Pierce, Rockford, IL) as described by the manufacturers.

## Toxin Oligomerization in BBMV

Oligomerization of Cry1Ac or Cry1AcMod toxins in BBMV was analyzed as previously described [21]. Activated toxins were used at two different concentrations (0.5 or 1.5 µg), these proteins were incubated with 15 µg of BBMV protein for 1 h at 37°C in a total volume of 50 µl of alkaline buffer, pH 10.5. Control samples contained only BBMV. The reactions were stopped with 1 mM PMSF and the BBMV were recovered by 30 min centrifugation at 50,000 rpm at 4°C or directly analyzed without centrifugation. The pellet was washed once with 100 µl of alkaline buffer, and finally suspended in 50 µl of the same buffer. Laemmli sample buffer 4X was added and incubated three min at 50°C. After heating, samples were separated in 8% SDS-PAGE, electro transferred to PVDF membrane and revealed in western blot assays as described above using anti-Cry1Ac antibody (1/30,000; 1 h) as the primary antibody. All assay were performed in triplicate

## Supporting Information

**S1 Table. Scanning densitometry data for comparing oligomer formation in resistant (AZP-R) and susceptible (APHIS-S) strains of *P. gossypiella*. (DOCX)**

## Acknowledgments

We thank Lizbeth Cabrera for technical assistance.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BT AB MS. Performed the experiments: JO JS RA BIGG IG GCU. Analyzed the data: BT AB MS. Contributed reagents/materials/analysis tools: BT AB MS. Wrote the paper: AB MS. Obtained funding: BT MS.

## References

1. Crickmore N, Zeigler DR, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, et al. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. 2011. Available: <http://www.btnomenclature.info/>.
2. Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research development and commercial applications. *Plant Biotechnol J*. 2011; 9: 283–300. doi: [10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x](https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x) PMID: [21375687](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21375687/)
3. James, C. Global status of commercialized biotech/GM Crops: 2014. *ISAAA Briefs* 49 (ISAAA, Ithaca, NY, 2014).
4. Mendelsohn M, Kough J, Vaituzis Z, Matthews K. Are Bt crops safe? *Nat Biotechnol*. 2003; 21: 1003–1009. PMID: [12949561](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12949561/)
5. Comas C, Lumbierres B, Pons X, Albajes R. No effects of *Bacillus thuringiensis* maize on nontarget organisms in the field in southern Europe: a meta-analysis of 26 arthropod taxa. *Transgenic Res*. 2014; 23: 135–143. doi: [10.1007/s11248-013-9737-0](https://doi.org/10.1007/s11248-013-9737-0) PMID: [23904218](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23904218/)
6. Nicolia A, Manzo A, Vironessi F, Rossellini D. An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research. *Critical Rev Biotechnol*. 2014; 34: 77–88 (2014).
7. Tabashnik BE. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev Entomol*. 1994; 39: 47–79.
8. Janmaat AF, Myers J. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage looper *Trichoplusia ni*. *Proc Royal Society- Biol-Science* 2003; 270: 2263–2270.
9. Tabashnik BE, Brevault T, Carrière Y. Insect resistance to Bt crops: Lessons from the first billion acres. *Nat Biotechnol*. 2013; 31: 510–521. doi: [10.1038/nbt.2597](https://doi.org/10.1038/nbt.2597) PMID: [23752438](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23752438/)
10. Gassmann AJ, Petzold-Maxwell JL, Clifton EH, Dunbar MW, Hoffman AM, Ingber DA et al. Field-evolved resistance by western corn rootworm to multiple *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic

- maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111: 5141–5146. doi: [10.1073/pnas.1317179111](https://doi.org/10.1073/pnas.1317179111) PMID: [24639498](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24639498/)
11. Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, Fresia P, Santos AC, et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Protect*. 2014; 64: 150–158.
  12. Monnerat R, Martins E, Macedo C, Queiroz P, Praça L, Soares E, et al. Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. *PLoS ONE*. 2015; 10: e0119544. doi: [10.1371/journal.pone.0119544](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119544) PMID: [25830928](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25830928/)
  13. Ferré J, Van Rie J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol*. 2002; 47: 501–533. PMID: [11729083](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11729083/)
  14. Wu Y. Detection and mechanisms of resistance evolved in insects to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Adv Insect Physiol*. 2014; 47: 297–342.
  15. Pigott CR, Ellar DJ. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Reviews*. 2007; 71: 255–281.
  16. Pacheco S, Gomez I, Arenas I, Saab-Rincon G, Rodriguez-Almazan C, Gill SS, 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: 32750–32757. doi: [10.1074/jbc.M109.024968](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.024968) PMID: [19808680](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19808680/)
  17. Arenas I, Bravo A, Soberón M, Gómez I. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *J Biol Chem*. 2010; 285: 12497–12503. doi: [10.1074/jbc.M109.085266](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.085266) PMID: [20177063](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20177063/)
  18. Gómez I, Sánchez J, Miranda R, Bravo A, Soberón M. 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: 242–246. PMID: [11904158](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11904158/)
  19. Zhang X, Candas M, Grinko NB, Taussig R, Bulla LA. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 9897–9902. PMID: [16788061](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16788061/)
  20. Vachon V, Laprade R, Schwartz JL. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *J Invertebr Pathol*. 2012; 111: 1–12. doi: [10.1016/j.jip.2012.05.001](https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.05.001) PMID: [22617276](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22617276/)
  21. Adang MJ, Crickmore N, Jurat-Fuentes JL. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxins and Mechanism of Action. *Adv Insect Physiol*. 2014; 47: 39–87.
  22. Ihara H, Himeno M. Study of the irreversible binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa to brush border membrane vesicles from *Bombyx mori* midgut. *J Invertebr Pathol*. 2008; 98: 177–183 doi: [10.1016/j.jip.2008.02.007](https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.02.007) PMID: [18433767](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18433767/)
  23. Gómez I, Sanchez J, Muñoz-Garay C, Matus V, Gill SS, Soberón M, 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: 383–396. doi: [10.1042/BJ20131408](https://doi.org/10.1042/BJ20131408) PMID: [24456341](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24456341/)
  24. Jiménez-Juárez N, Muñoz-Garay C, Gómez I, Saab-Rincon G, Damian-Almazo JY, Gill SS, et al. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non toxic to *Manduca sexta* larvae. *J Biol Chem*. 2007; 282: 21222–21229. PMID: [17537728](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17537728/)
  25. Peng D, Xu X, Ye W, Yu Z, Sun M. *Helicoverpa armigera* cadherin fragment enhances Cry1Ac insecticidal activity by facilitating toxin-oligomer formation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010; 85: 1033–1040. doi: [10.1007/s00253-009-2142-1](https://doi.org/10.1007/s00253-009-2142-1) PMID: [19652967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19652967/)
  26. Gahan LJ, Gould F, Heckel DG. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*. 2001; 293: 857–860. PMID: [11486086](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11486086/)
  27. Morin S, Biggs RW, Shriver L, Eilers-Kirk C, Higginson D, Holley D, et al. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100: 5004–5009. PMID: [12695565](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12695565/)
  28. Xu X, Yu L, Wu Y. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71: 948–954. PMID: [15691952](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15691952/)
  29. Tabashnik BE, Patin AL, Dennehy TJ, Liu Y-B, Carrière Y, Sims MA, et al. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97: 12980–12984. PMID: [11087854](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11087854/)
  30. Tabashnik BE, Carrière Y, Dennehy TJ, Morin S, Sisterson MS, Roush RT, et al. Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from laboratory and field. *Journal Econ Entomol*. 2003; 96: 1031–1038.
  31. Soberón M, Pardo-López L, López I, Gómez I, Tabashnik B, Bravo A. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science* 2007; 318: 1640–1642. PMID: [17975031](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17975031/)

32. Tabashnik BE, Huang F, Ghimire MN, Leonard BR, Siegfried BD, Rangasamy M, et al. Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different mechanisms of resistance. *Nature Biotechnol.* 2011; 29: 1128–1131.
33. Li Y, Wu J, Liu Ch, Yuan X, Wu K, Liang G, et al. Comparative analysis of Cry1Ac toxin oligomerization and pore formation between Bt-susceptible and Bt-resistant *Helicoverpa armigera* larvae. *J Integr Agricul.* 2012; 11: 1845–1851.
34. Chen W, Liu Ch, Xiao Y, Zhang D, Zhang Y, Li X, et al. A toxin-binding alkaline phosphatase fragment synergizes Bt toxin Cry1Ac against susceptible and resistant *Helicoverpa armigera*. *Plos One.* 2015; 10: e0126288 doi: [10.1371/journal.pone.0126288](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126288) PMID: [25885820](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25885820/)
35. Xiao Y, Zhang T, Liu Ch, Heckel DG, Li X, Tabashnik BE, et al. Mis-splicing of the ABCC2 gene linked with Bt toxin resistance in *Helicoverpa armigera*. *Sci Rep.* 2014; 4: 6184 doi: [10.1038/srep06184](https://doi.org/10.1038/srep06184) PMID: [25154974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25154974/)
36. González-Cabrera J, Escrache B, Tabashnik BE, Ferré J. Binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in resistant and susceptible strains of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*). *Insect Biochem Mol Biol.* 2003; 33: 929–935. PMID: [12915184](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12915184/)
37. Tabashnik BE, Fabrick JA, Unnithan GC, Yelich AJ, Masson L, Zhang J, B et al. Efficacy of genetically modified Bt toxins alone or in combinations against Pink Bollworm resistant to Cry1Ac and Cry2Ab. *PLoS ONE.* 2013; 8: e80496 doi: [10.1371/journal.pone.0080496](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080496) PMID: [24244692](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24244692/)
38. Liu YB, Tabashnik BE, Dennehy TJ, Patin AL, Sims MA, Meyer SK, et al. Effects of Bt cotton and Cry1Ac toxin on survival and development of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). *J Econ Entomol.* 2001; 94: 1237–1242 PMID: [11681689](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11681689/)
39. Wolfersberger MG. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the gypsy moth (*Lymantria dispar*). *Archives Insect Biochem Physiol.* 1993; 24: 139–147.