



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

## “Identificación y caracterización de los receptores de la toxina Cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* en *Manduca sexta*”

### TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**Maestra en Ciencias**

**PRESENTA:**

**Meztlli Ofelia Gaytán Enríquez**

**Tutor principal:**

Dra. Claudia Rodríguez Almazán (IBT, UNAM)

**Miembros del comité tutor:**

Dra. Rosario Vera Estrella (IBT, UNAM)

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva (IBT, UNAM)

México, D.F. Diciembre, 2013



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.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	iv
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<i>Bacillus thuringiensis</i> .....	1
Toxinas Cry .....	2
Mecanismo de acción .....	4
Modelo de unión secuencial. ....	5
Modelo de señalización .....	7
Receptores de las toxinas Cry .....	8
Resistencia a toxinas Cry .....	18
Estrategias para contender con la resistencia .....	21
<b>ANTECEDENTES</b> .....	24
Receptores de la toxina Cry2Ab .....	24
Resistencia cruzada entre toxinas Cry1 y Cry2. ....	27
Alelos ligados a resistencia .....	30
<b>HIPÓTESIS</b> .....	33
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	33
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	33
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	34
Cepas bacterianas y medios de cultivo .....	34
Purificación de toxinas Cry .....	34
Cuantificación de proteínas .....	35
Generación de anticuerpos policlonales .....	37
Inmunodetección ( <i>Western blot</i> ) .....	37
Bioensayos .....	37
Aislamiento de intestinos de <i>M. sexta</i> .....	38
Preparación de BBMV's .....	38
Rasurado de BBMV's con PI-PPLC .....	39
Actividad de fosfatasa alcalina .....	39
Actividad de aminopeptidasa .....	40

Marcaje de proteínas con biotina.....	40
Ensayos de unión en solución.....	40
Competencia homóloga y heteróloga de unión. ....	41
Inducción de proteínas recombinantes .....	41
Purificación de proteínas recombinantes .....	41
<i>Ligand blot</i> .....	42
Electroforesis de dos dimensiones .....	43
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	44
Purificación de la toxina Cry2Ab .....	44
Generación de anticuerpos policlonales contra Cry2Ab.....	45
Bioensayo .....	46
Activación de la protoxina .....	47
Marcaje de Cry1Ab y Cry2Ab con biotina.....	50
Preparación de BBMV's .....	51
Unión de Cry1Ab y Cry2Ab a BBMV's de <i>M. sexta</i> .....	52
Competencias de unión .....	53
<i>Ligand blot</i> de Cry1Ab y Cry2Ab a ALP y caderina (repetidos 7-12).....	56
<i>Ligand blot</i> de Cry2Ab a BBMV's de <i>M. sexta</i> .....	59
<i>Ligand blot</i> de Cry2Ab a proteínas ancladas por GPI a BBMV's de <i>M. sexta</i> .....	61
Identificación de proteínas de unión a Cry2Ab mediante enfoques proteómicos .....	63
Proteínas de unión a Cry2Ab en <i>M. sexta</i> . .....	67
Papel de la actina en el mecanismo de acción de las toxinas Cry. ....	70
Influencia de las V-ATPasas en la toxicidad de las toxinas Cry.....	71
APN2 y 3 como receptores de las toxinas Cry.....	73
Proteínas ribosomales y su relación con la toxicidad de toxinas Cry.....	74
<b>CONCLUSIONES</b> .....	76
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	76
<b>APÉNDICE I</b> .....	77
<b>APÉNDICE II</b> .....	81
<b>APÉNDICE III</b> .....	81
<b>REFERENCIAS</b> .....	82

# ABREVIATURAS

---

ALP	Fosfatasa alcalina
APN	Aminopeptidasa N
BBMVs	Vesículas de membrana apical (por sus siglas en inglés).
Bin	Toxinas binarias
BSA	Albúmina sérica bovina
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CR	Caderina
CR7-12	Repetidos 7 al 12 de caderina
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol bis (2-aminoetiléter) tetraacético.
GalNac	N-acetil-galactosamina
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
GTP	Guanosín trifosfato
HCT	Medio mínimo de esporulación
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Medio Luria-Bertani
LC <sub>50</sub>	Concentración letal media
Mtx	Toxinas mosquitocidas
PBS	Amortiguador de fosfato salino
pI	Punto isoeléctrico
PI-PLC	Fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol.
PKA	Proteína cinasa A
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RNAi	Ácido ribonucleico interferente
RR	Proporción de resistencia (por sus siglas en inglés).
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Vip	Proteínas insecticidas de fase vegetativa

---

# RESUMEN

*Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria Gram positiva. Una de sus principales características es que durante la fase de esporulación produce cristales proteicos formados por las  $\delta$ -endotoxinas Cry y Cyt. Estas toxinas pertenecen a la familia de toxinas formadoras de poro y son activas contra diversos órdenes de insectos como: Lepidópteros, Coleópteros, Dípteros e Himenópteros, así como para algunos nematodos y protozoarios.

Debido a su actividad insecticida, las toxinas Cry se emplean en la generación de insecticidas tópicos así como en el desarrollo de plantas transgénicas. Sin embargo, el uso extensivo de estos bioinsecticidas aumenta la probabilidad de generación de insectos resistentes. De hecho, en años recientes, se han aislado al menos siete insectos resistentes en el campo.

Una de las estrategias implementadas para contender con la evolución de la resistencia es el apilamiento de genes. Esta estrategia consiste en la coexpresión de dos o más toxinas que sean activas contra un mismo insecto, pero que se unan a distintos receptores. Esto último debido a que el mecanismo de resistencia más frecuente involucra defectos en la unión de la toxina a sus receptores.

Actualmente se comercializa la planta transgénica de algodón Bollgard II, que expresa a las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab. Esta combinación de toxinas se emplea debido a que la selección de resistencia contra Cry1Ac no genera resistencia cruzada contra Cry2Ab y viceversa. Además, se ha demostrado que las toxinas Cry1A y Cry2A no compiten por los mismos sitios de unión. Lo anterior, nos llevó a proponer que las toxinas Cry1Ab y Cry2Ab se unen a distintos receptores.

En este trabajo demostramos que Cry2Ab es activa contra *Manduca sexta* y no compite con Cry1Ab por la unión a vesículas de microvellosidad apical (BBMVs) de *M. sexta*. Adicionalmente, observamos que Cry2Ab no se une al receptor

alcalino fosfatasa (ALP) ni a los repetidos 7 al 12 del receptor de caderina sobreexpresados en *E. coli*.

Mediante *ligand blots* de Cry2Ab a BBMV's de *M. sexta* separados mediante SDS-PAGE y geles de dos dimensiones se demostró la unión de Cry2Ab a varias proteínas de *M. sexta* que mediante espectrometría de masas se identificaron como: actina, subunidad A de la V-ATPasa, proteína ribosomal P0 y la aminopeptidasa N de clase 2 y 3.

# INTRODUCCIÓN

Las plagas de cultivos causan daños importantes a la agricultura y economía de los países. Se estima que existen alrededor de 67 000 especies que dañan diversos sembradíos, provocando una pérdida de casi 40 % de la producción de cultivos agrícolas a nivel mundial, siendo las plagas de insectos (~ 9000 especies) la principal causa de estas pérdidas [1].

Desde 1960, el control de plagas se ha basado en el uso intensivo de pesticidas químicos; sin embargo, el uso de estos productos ha causado diversos problemas incluyendo contaminación ambiental, efectos adversos en organismos benéficos, así como daños a la salud humana. Una de las alternativas para el control de plagas ha sido el empleo de agentes de control biológico como los bioinsecticidas, los cuales, además de ser altamente específicos contra sus insectos blanco e inocuos para humanos y otros vertebrados, no son dañinos contra el medio ambiente. En este sentido, el patógeno de insectos más empleado es la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt), que representa aproximadamente el 2 % total del mercado de insecticidas. Además del empleo de los productos Bt como insecticidas tópicos, también se han desarrollado plantas transgénicas a partir de las toxinas producidas por Bt.

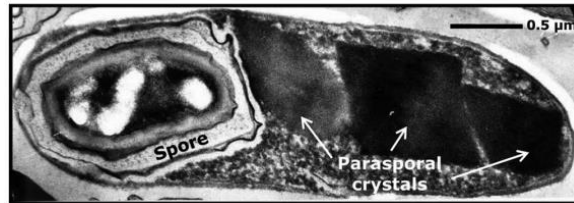
## ***Bacillus thuringiensis***

Bt es una bacteria Gram positiva, ubicua y aerobia estricta. Tiene un ciclo de vida bifásico: una fase de crecimiento vegetativo durante la cual la bacteria se reproduce por bipartición; y la fase de esporulación, que consiste en la diferenciación de bacteria a espora cuando los nutrientes son limitados [2].

Durante la fase de esporulación se producen cristales paraesporales (figura 1) de naturaleza proteica compuestos por  $\delta$ -endotoxinas Cry y Cyt (en el caso particular de *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis*), las cuales confieren a la



bacteria actividad insecticida contra diversos órdenes de insectos como lepidópteros, coleópteros, dípteros e himenópteros así como nematodos y protozoarios [3].



**Figura 1.** Micrografía de transmisión electrónica de una célula esporulada de *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrison*. Las flechas blancas señalan los cristales paraesporales compuestos de  $\delta$ -endotoxinas. Tomada de [4].

## Toxinas Cry

Los cristales paraesporales de Bt están compuestos por protoxinas. Se han descrito dos grupos de protoxinas: largas, como Cry1Aa de 130 kDa y cortas de 70 kDa como Cry2Aa [5], éstas deben ser procesadas por proteasas del hospedero (ver mecanismo de acción) para liberar al fragmento activo que se conoce como toxina.

Las toxinas Cry se clasifican en 72 grupos de acuerdo a la similitud de secuencia de aminoácidos y, cada tipo de toxina es activa contra blancos específicos. La nomenclatura de las toxinas se basa en los siguientes criterios: el primer caracter está dado por un número arábigo (1-72), éste sólo cambia si la identidad es menor al 45 % (Cry1-Cry72). El segundo caracter es una letra mayúscula (Cry1A, Cry1B, Cry1C, etc), la cual denota un porcentaje de identidad mayor a 45 % pero menor al 78 %. El tercer caracter indica una identidad de secuencia entre 78 y 95 % y se denota con una letra minúscula (Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac). Por último, se asignó un cuarto caracter que consiste en un número arábigo, y sólo se emplea cuando la identidad de secuencia es mayor al 95 % (Cry1Aa1, Cry1Aa2, etc.) [6].

Las toxinas Cry se dividen en cuatro grupos no relacionados filogenéticamente: toxinas Cry de tres dominios (3D), mosquitocidas (Mtx), binarias (Bin) y toxinas Cyt. Algunas cepas de Bt también producen otras toxinas insecticidas denominadas Vip, sin embargo, éstas se producen durante la fase vegetativa de crecimiento.

Las toxinas Cry 3D pertenecen a la familia de toxinas formadoras de poro y, están constituidas por tres dominios estructurales:

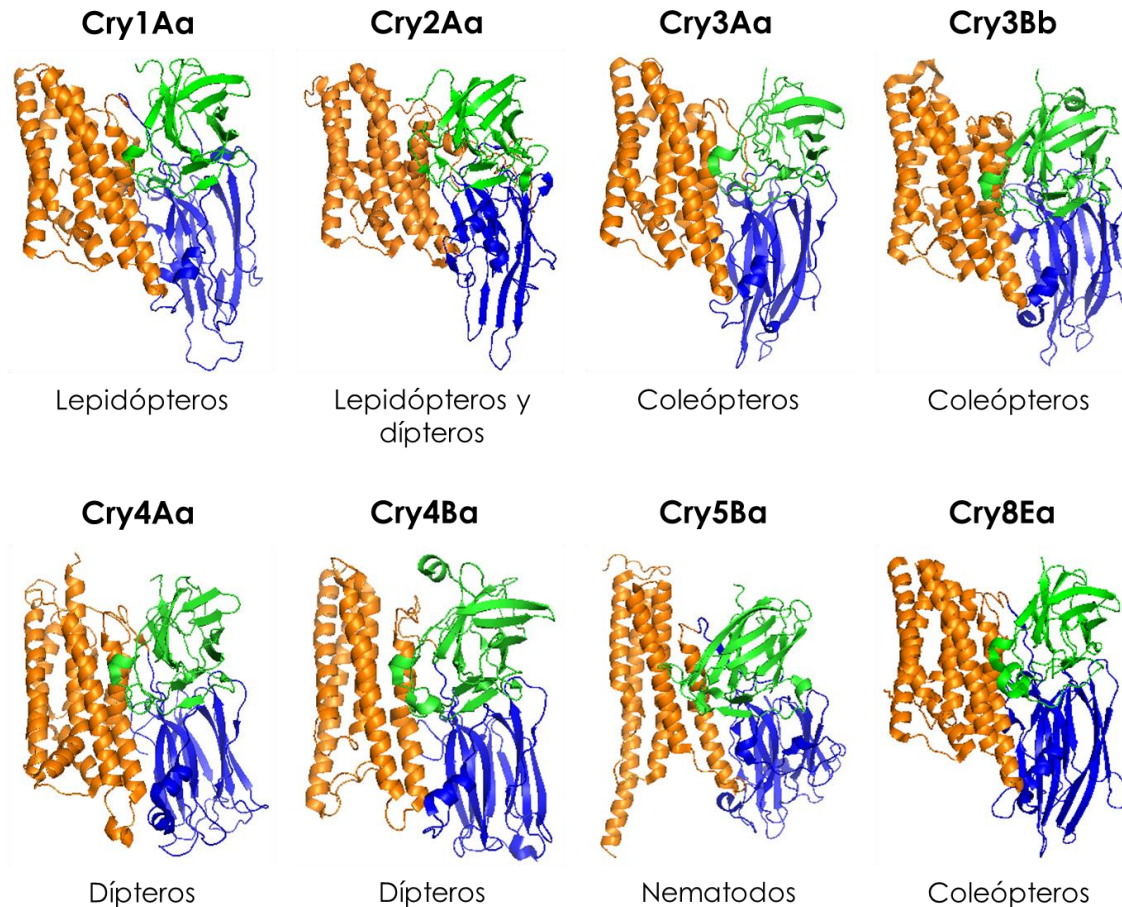
**Dominio I:** este dominio comparte similitud estructural con otras toxinas formadoras de poro como la colicina Ia y N así como con la toxina diftérica. El dominio I está implicado en la oligomerización de la toxina, inserción en la membrana y formación de poros. Está formado por siete  $\alpha$ -hélices antiparalelas, las hélices  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2,  $\alpha$ -3,  $\alpha$ -4,  $\alpha$ -6 y  $\alpha$ -7 son de naturaleza anfifílica y rodean a la hélice hidrofóbica  $\alpha$ -5. Hasta la fecha, se sabe que la hélice  $\alpha$ -3 está implicada en la oligomerización de la toxina [7, 8], y se propone que las hélices  $\alpha$ -4 y  $\alpha$ -5 se insertan en la membrana y forman un poro [9-12].

**Dominio II:** el dominio II es un prisma beta formado por tres hojas  $\beta$  antiparalelas empacadas alrededor de un núcleo hidrofóbico con asas expuestas que están involucradas en el reconocimiento de receptores [13]. Estructuralmente, el dominio II es el más variable. Dada esta variabilidad se cree que este dominio es un determinante importante de la especificidad de las toxinas [14].

**Dominio III:** consiste de dos hojas  $\beta$  antiparalelas que forman un sándwich beta. Este dominio muestra menos variabilidad estructural que el dominio II [14], pero al igual que éste, está implicado en la especificidad de la toxina debido a que media interacciones específicas con diferentes proteínas del intestino de los insectos [13].

Mediante cristalografía de rayos X, se resolvió la estructura tridimensional de ocho toxinas Cry de tres dominios: Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry5Ba y Cry8Ea [14-21]. Como se aprecia en la figura 2, a pesar de que

las toxinas son específicas contra diferentes órdenes de insectos, todas ellas comparten una alta similitud estructural. El hecho de que la estructura tridimensional esté conservada sugiere que podrían actuar a través de un mecanismo de acción similar.



**Figura 2.** Estructura terciaria de 8 toxinas Cry cristalizadas: Cry1Aa (PDB: 1CIY), Cry2Aa (PDB: 115P), Cry3Aa (PDB: 1DLC), Cry3Bb (PDB: 1JI6), Cry4Aa (PDB: 2C9K), Cry4Ba (PDB: 1W99), Cry5Ba (PDB: 4D8M) y Cry8Ea (PDB: 2QKG). En anaranjado se muestra el dominio I, en azul el dominio II y en verde el dominio III.

### Mecanismo de acción

Como se mencionó previamente, las toxinas Cry se producen como protoxinas, las cuales se empaquetan formando cristales proteicos. Cuando estos cristales son ingeridos por las larvas de los insectos, se solubilizan en el lumen del intestino

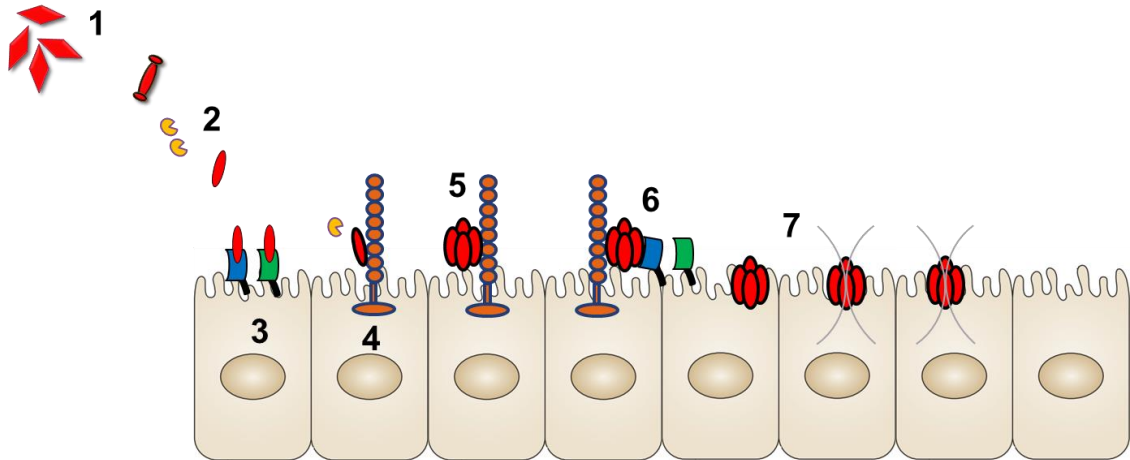
debido al pH alcalino (pH 10-11) y las condiciones reductoras que permiten la ruptura de puentes disulfuro, liberando así a la protoxina soluble [3]. Las protoxinas adoptan su forma activa (toxina) al ser procesadas por proteasas del hospedero. Las principales proteasas en el intestino de insectos son de tipo tripsina y quimiotripsina. Las protoxinas largas (130 kDa) se procesan a la mitad del extremo C-terminal y además se eliminan de 20 a 50 aminoácidos del N-terminal, mientras que las protoxinas cortas (70 kDa) se procesan exclusivamente en la región N-terminal [2]. Finalmente, la forma activa de la toxina atraviesa la matriz peritrófica y se une a receptores presentes en la membrana apical de las células epiteliales del intestino.

A la fecha se han propuesto dos mecanismos de acción para explicar el proceso a través del cual las toxinas Cry inducen la muerte celular:

- **Modelo de unión secuencial:** propone que la unión secuencial de la toxina con diversos receptores permite que ésta oligomerice y se inserte en la membrana de los enterocitos, formando un poro no selectivo que causa un desbalance osmótico que a su vez provoca la muerte celular por lisis.
- **Modelo de señalización:** este modelo sugiere que la unión de la toxina Cry al receptor de caderina desencadena una vía de señalización intracelular que induce la muerte celular por necrosis.

### **Modelo de unión secuencial.**

Este mecanismo de acción ha sido caracterizado principalmente en el lepidóptero *Manduca sexta* para la toxina Cry1Ab. Esta toxina se une de manera secuencial a diferentes receptores dependiendo de su estado oligomérico (figura 3).



**Figura 3.** Modelo de unión secuencial de las toxinas Cry1A en *M. sexta*. 1) Solubilización de cristales. 2) Activación de la protoxina. 3) Unión del monómero a ALP y APN. 4) Unión del monómero a caderina y corte de la  $\alpha$ -hélice 1. 5) Oligomerización. 6) Unión del oligómero a ALP y APN. 7) Inserción en membrana y formación del poro. Modificado de [22].

La forma monomérica de la toxina se une con baja afinidad a los receptores fosfatasa alcalina (ALP,  $K_d = 267.3$  nM) y aminopeptidasa N (APN,  $K_d = 101.6$  nM) [23, 24]. Estos receptores anclados por glicosilfosfatidil inositol (GPI) son abundantes en las células del intestino (más de 15 % del total de proteínas), es por ello que se propuso que esta interacción concentra a la toxina en la membrana de las microvellosidades de las células del intestino, en donde posteriormente se une con mayor afinidad ( $K_d = 1$  nM) a los repetidos 7, 11 y 12 del receptor de tipo caderina (Bt-R<sub>1</sub>) [23].

La interacción de la toxina Cry1Ab con los receptores de tipo caderina facilita otro corte proteolítico, en este caso se elimina un fragmento del extremo N-terminal que incluye la hélice  $\alpha$ -1 del dominio I. Esta modificación induce un cambio conformacional que promueve la oligomerización de la toxina, y a esta estructura se le denomina pre-poro [25]. El pre-poro se une con mayor afinidad a los receptores ALP ( $K_d = 0.52$  nM) y APN ( $K_d = 0.6$  nM) [26] y como resultado, se inserta en la membrana [27]. La inserción del oligómero se lleva a cabo en balsas lipídicas [28, 29], y se propuso que las hélices  $\alpha$ -4 y  $\alpha$ -5 del dominio I están implicadas en la formación de un poro con un diámetro aproximado de 1-2 nm

[15]. El poro que se forma en la membrana celular permite el paso de iones, agua y moléculas pequeñas lo cual provoca un desbalance osmótico y finalmente causa la muerte celular [30-32].

### Modelo de señalización

En 2005 Zhang y colaboradores [33, 34] propusieron un mecanismo de acción de las toxinas Cry alternativo al de unión secuencial basado en sus trabajos con la toxina Cry1Ab en la línea celular High Five (H5: originada de células no diferenciadas de ovario del lepidóptero *Trichoplusia ni*).

El modelo de señalización (figura 4) propone que la unión de la toxina Cry1Ab monomérica a la caderina activa una vía de señalización dependiente de  $Mg^{2+}$ . En esta vía participa una proteína G que mediante la hidrólisis de GTP activa a la adenilato ciclasa la cual incrementa los niveles de cAMP, lo que resulta en la activación de la cinasa PKA. Finalmente, PKA enciende una vía de señalización, que a la fecha no ha sido descrita, pero que induce la muerte celular por necrosis.

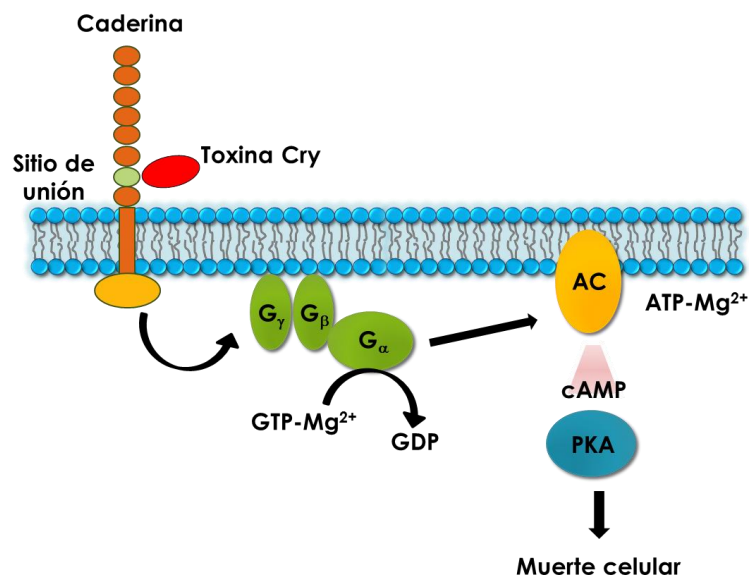


Figura 4. Modelo de señalización de las toxinas Cry [33].

Los autores de este trabajo afirman que la inducción de la muerte celular por toxinas Cry no requiere de la formación de un oligómero ni de su inserción en la membrana o la formación de un poro. Sin embargo, los dos mecanismos de acción aquí descritos se basan en trabajos realizados en modelos celulares distintos (insectos y líneas celulares) por lo que no se descarta la validez de ninguno de ellos en sus respectivos modelos, de hecho, *in vivo*, la actividad de las toxinas Cry podría ser el resultado de ambos mecanismos.

Aunque los mecanismos específicos que resultan en la muerte celular siguen siendo controversiales, la interacción entre las toxinas Cry y los receptores en las células hospederas es necesaria, aunque no suficiente, para la susceptibilidad de los insectos.

### **Receptores de las toxinas Cry**

Las toxinas Cry son altamente selectivas y matan a un número limitado de especies de insectos. Esta especificidad se debe principalmente a la interacción de las toxinas Cry con diferentes receptores localizados en la membrana de las células epiteliales del intestino de los insectos blanco. Se han identificado diversas proteínas que unen a las toxinas Cry (Tabla 1): proteínas de tipo caderina [35], aminopeptidasa N [36] y fosfatasa alcalina [37] ancladas por GPI, transportador ABC, un glicoconjugado de 270 kDa [38], una proteína de 250 kDa denominada P252 [39],  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -glucosidasa y la ADAM-3 metaloproteasa. Adicionalmente, se propuso que los glicolípidos también funcionan como sitios de unión de las toxinas Cry [40]. Sin embargo, sólo se ha demostrado la funcionalidad de la ALP, APN y caderina como receptores de las toxinas Cry.

**Tabla 1. Moléculas de unión a toxinas Cry.**

<b>Proteína de unión</b>	<b>Organismo en el que se identificó</b>	<b>Toxinas a las que se une</b>
<b>Caderina</b>	<i>Manduca sexta</i>	Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac
	<i>Heliothis virescens</i>	Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac
	<i>Ostría nubilalis</i>	Cry1Ab
	<i>Helicoverpa armigera</i>	Cry1Ac
	<i>Bombyx mori</i>	Cry1Aa
	<i>Pectinophora gossypiella</i>	Cry1Ac
	<i>Limantria dispar</i>	Cry1A
	<i>Anopheles gambiae</i>	Cry4Ba
	<i>Aedes aegypti</i>	Cry11Aa
	<i>Tenebrio molitor</i>	Cry3Aa
<b>APN</b>	<i>Manduca sexta</i>	Cry1Aa <sup>1</sup> , Cry1Ab <sup>1</sup> , Cry1Ab <sup>5</sup> <sup>2</sup> y Cry1Ac <sup>1</sup>
	<i>Bombyx mori</i>	Cry1Aa <sup>1,3,4</sup> y Cry1Ab <sup>1,3,4</sup>
	<i>Helicoverpa armigera</i>	Cry1Aa <sup>1</sup> , Cry1Ab <sup>1</sup> y Cry1Ac <sup>1,3</sup>
	<i>Heliothis virescens</i>	Cry1Ab <sup>1</sup> , Cry1Ac <sup>1,3</sup> y Cry1Fa <sup>1,4</sup>
	<i>Lymantria dispar</i>	Cry1Ac <sup>1,3</sup>
	<i>Plutella xylostella</i>	Cry1Aa <sup>1,2,3,5</sup> y Cry1Ab <sup>1,2,3,5</sup>
	<i>Spodoptera litura</i>	Cry1Ca <sup>3,5</sup>
	<i>Epiphyas postvittana</i>	Cry1Aa <sup>3</sup> y Cry1Ba <sup>3</sup>
	<i>Aedes aegypti</i>	Cry11Aa y Cry4Ba
	<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	Cry11Ba
<b>ALP</b>	<i>Manduca sexta</i>	Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac
	<i>Helicoverpa armigera</i>	Cry1Aa y Cry1Ac
	<i>Heliothis virescens</i>	Cry1Ac
	<i>Aedes aegypti</i>	Cry4Ba y Cry11Aa
	<i>Anthonomus grandis</i>	Cry8Ka5
<b>ABCC2</b>	<i>Tenebrio molitor</i>	Cry3Aa
	<i>Bombyx mori</i> <sup>*</sup>	Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac
<b>BTR-270</b>	<i>Lymantria dispar</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ba y Cry1Ac
<b>P252</b>	<i>Bombyx mori</i>	Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac
<b>α-amilasa</b>	<i>Anopheles albimanus</i>	Cry4Ba y Cry11Aa
<b>β-glucosidasa</b>	<i>Popillia japónica</i>	Cry8Da
<b>ADAM-3</b>	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Cry3Aa
<b>Glicolípidos<sup>‡</sup></b>	<i>Manduca sexta</i>	Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Cry5Ba

Proteínas y otras moléculas (<sup>‡</sup>) a las que se unen las toxinas Cry en insectos lepidópteros (negro), dípteros (azul), coleópteros (verde) y nematodos (naranja). Los superíndices en las toxinas que unen a APNs indican la clase de APN a la que unen. \* El ABCC2 de *B. mori* se sobreexpresó en células Sf9.



## ⊙ **Receptores de tipo caderina**

La superfamilia de proteínas de tipo caderina es muy diversa y realiza una gran variedad de funciones, incluyendo adhesión celular, migración, organización del citoesqueleto y morfogénesis [41]. Estas proteínas tienen dominios repetidos de unión a calcio o repetidos de caderina (CR) de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud, usualmente tienen 5 repetidos pero se han reportado caderinas hasta con 34 repetidos. Son proteínas glicosiladas y regularmente tienen un sólo cruce transmembranal, aunque se han identificado variantes con 7 cruces o ancladas por GPI [42, 43].

En insectos lepidópteros las proteínas de tipo caderina están compuestas por tres dominios: un dominio extracelular formado por 11 a 12 repetidos de caderina (CR), un dominio transmembranal y un dominio intracelular pequeño [41]. A diferencia de las caderinas clásicas que se localizan principalmente en las uniones adherentes, las proteínas de tipo caderina identificadas en lepidópteros se localizan en la membrana apical de las células columnares del epitelio intestinal [44], que es el sitio de acción de las toxinas Cry.

Se ha demostrado que las proteínas de tipo caderina son blanco de unión de las toxinas Cry en por lo menos seis especies de lepidópteros: *M. sexta*, *Bombyx mori*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa armigera*, *Pectinophora gossypiella* y *Ostrinia nubilalis* [13], así como en algunas especies de dípteros: *Anopheles gambiae* y *Aedes aegypti* [45, 46] y coleópteros: *Tenebrio molitor* y *Diabrotica virgifera virgifera* [47, 48].

BT-R<sub>1</sub> es una glicoproteína de tipo caderina de 210 kDa. Esta proteína se identificó en *M. sexta* mediante inmunoprecipitación con Cry1Ab seguida de electroforesis en gel de dos dimensiones [49]. Se han identificado tres regiones de la caderina que participan en la interacción con las toxinas Cry1A: el repetido 7 de BT-R<sub>1</sub> interactúa con el asa 2 del dominio II de Cry1Ab y el repetido 11

interactúa con las asas  $\alpha$ -8 y 2 del mismo dominio y en *H. virescens* el repetido 12 interactúa con el asa 3 del dominio II de Cry1Ac [50].

Se ha propuesto que la caderina es un determinante importante de la especificidad de las toxinas Cry1A ya que al transfectar células S2, COS-7 y H5 con BT-R<sub>1</sub> estas líneas celulares se vuelven susceptibles a las toxinas Cry1A [51]. El papel de las proteínas de tipo caderina como receptores de las toxinas Cry1A se refuerza por el hecho de que la resistencia a la toxina Cry1Ac de una línea de *H. virescens* (YHD2) seleccionada en laboratorio, está ligada a una mutación por inserción de un retrotransposón en el gen de caderina [52]. Adicionalmente, la caracterización de diversas cepas de *P. gossypiella* resistentes a las toxinas Cry, aisladas en campo y seleccionadas en laboratorio, reveló que la resistencia a las toxinas está asociada a 3 alelos de caderina mutados [53]. Finalmente, se demostró que la caderina es un receptor funcional de las toxinas Cry1A, ya que al silenciar el gen con RNA de interferencia en *M. sexta*, las larvas se vuelven tolerantes a la toxina Cry1Ab, lo cual indica que la caderina juega un papel importante en el mecanismo de acción de las toxinas [54].

### ⊙ **Aminopeptidasa N (APN)**

La aminopeptidasa N es una exopeptidasa anclada por GPI. Estas enzimas se encargan de cortar aminoácidos neutros del extremo N-terminal de los polipéptidos. En el intestino de insectos lepidópteros, trabajan junto con endo y carboxipeptidasas para digerir proteínas derivadas de la dieta de los insectos [55]. En *M. sexta* y *H. virescens* se demostró que tanto la APN como la ALP se encuentran en balsas lipídicas, a diferencia de los receptores de tipo caderina.

Las APNs identificadas en insectos comparten varias características: los genes codifican para proteínas de aproximadamente 1000 aminoácidos, sufren varias modificaciones postraduccionales para producir proteínas maduras de entre 90 y 170 kDa, tienen un péptido señal en el N-terminal que dirige a los polipéptidos

nacientes a la superficie externa de la membrana citoplásmica y están anclados a la membrana por GPI [56-59].

Diversas APNs se han descrito como receptores de toxinas Cry en diferentes especies de lepidópteros como *H. virescens*, *Spodoptera litura*, *H. armígera*, *B. mori*, *Lymantria dispar* y *Plutella xylostella*. Análisis filogenéticos sugieren que en insectos lepidópteros hay por lo menos 5 familias diferentes de APNs [55].

**Clase 1.** Las APNs de clase 1 se han identificado en nueve especies de lepidópteros. Además de las características antes mencionadas, generalmente tienen una secuencia rica en treoninas. Se cree que esta región contiene muchas O-glicosilaciones. Las APNs de *B. mori* [60], *M. sexta* [36] y *H. virescens* [61] tienen una masa molecular de 120, 120 y 170 kDa respectivamente, y un total de 6, 10 y 36 sitios predichos de O-glicosilación. Se ha observado que cinco de las nueve APNs descritas se unen a toxinas Cry. La interacción mejor caracterizada es de la toxina Cry1Ac a la APN de *M. sexta*, la cual requiere del carbohidrato GalNac (N-acetil galactosamina) presente en la región rica en treoninas [36].

**Clase 2.** Los miembros de esta clase carecen de una región rica en treoninas pero sí se N-glicosilan. Sin embargo, no se ha demostrado que la toxina Cry1Ac se una a ninguna APN de esta clase. En contraste, se reportó que Cry1Aa y Cry1Ab se unen a APNs de clase 2 [57, 62].

**Clase 3.** Es el grupo más grande de APNs conocidas en lepidópteros, con once miembros de diferentes especies. Esta clase es la más relacionada con las de clase 1 ya que tienen una región rica en treoninas en el C-terminal. Todas las APNs de esta familia que se han aislado de BBMV (vesículas de la membrana apical) tienen una masa molecular de ~120 kDa. En esta clase, se han descrito APNs que se unen a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba y Cry1Fa.

**Clase 4.** Igual que las de clase 2, carecen de la región rica en treoninas en el C-terminal. Consta de nueve miembros, de los cuales sólo tres se han descrito

como blancos de unión de las toxinas Cry [56, 62, 63]. En *H. virescens* se identificó una APN de clase 4 con una masa molecular de 110 kDa que se une a las toxinas Cry1Ac y Cry1Fa [63].

**Clase 5.** Este grupo es el más pequeño, consiste de sólo 3 miembros identificados en *P. xylostella* [62] y *H. armigera*. Existe una marcada diferencia entre la secuencia de aminoácidos de estas APNs. Sólo se ha demostrado la unión a toxinas Cry en los lepidópteros *P. xylostella* y *S. litura*.

**Otras APNs.** Además de las APNs descritas, se identificaron otras dos variantes de 106 y 96 kDa en *M. sexta* y *B. mori*, respectivamente, que unen a las toxinas Cry1Ca y Cry1Aa (APN de *M. sexta*) [64] y Cry1Ac (APN de *B. mori*) [65].

En el díptero *Ae. aegypti* se identificaron dos isoformas de APN (AeaAPN1 y AeaAPN2) que se unen a la toxina Cry11Aa. También se demostró que algunos fragmentos proteicos de estas APNs pueden inhibir la unión de Cry11Aa a las BBMV de *Ae. Aegypti*. En el caso de *An. quadrimaculatus* y *An. gambiae* se identificaron dos APNs que unen a la toxina Cry11Ba con alta afinidad: 0.56 nM [66] y 6.4 nM respectivamente.

Se ha demostrado que las APNs participan en la inserción de la toxina en las membranas, ya que al tratar a las BBMV con fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol, que libera a las proteínas ancladas por GPI (incluyendo a la APN), se disminuye la incorporación de Cry1Ab a balsas lipídicas [28] y se reduce drásticamente la formación de poros [67].

El papel funcional de la APN en el mecanismo de acción de las toxinas Cry se demostró en una población de *S. exigua* que es resistente a Cry1Ca, esta cepa carece del transcrito de APN-1, lo anterior sugiere que la APN está involucrada en la toxicidad de Cry1C [68]. Finalmente, en el caso de *S. litura*, el silenciamiento de la APN con dsRNA resultó en una disminución de la susceptibilidad a Cry1Ca,

indicando que la APN juega un papel importante en la toxicidad de Cry1C contra estas especies de insectos [68].

### ⊙ **Fosfatasa alcalina (ALP).**

Las ALPs se encuentran en todos los animales y se dividen en dos grupos: solubles (s-ALP) y membranales (m-ALP), las cuales se encuentran en balsas lipídicas [69, 70]. En insectos, ambas formas de ALPs se encuentran en las células epiteliales del intestino, sin embargo, se expresan en diferentes tipos celulares. Las s-ALPs se encuentran exclusivamente en la cavidad de células globet y en la región apical del intestino, mientras que las m-ALPs se localizan en la membrana de las microvellosidades de células columnares y están particularmente restringidas al intestino medio y posterior [69].

Se han descrito diversas m-ALPs ancladas por GPI que se unen a toxinas Cry en lepidópteros (*M. sexta*, *H. virescens* y *H. armígera*), dípteros (*Ae. aegypti*) y coleópteros (*A. grandis* y *T. molitor*) [37, 71, 72]. En el caso del lepidóptero *M. sexta* se demostró que las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac se unen a una ALP de 65 kDa, aunque con diferentes afinidades ( $K_d = 268\text{nM}$ ,  $289\text{ nM}$  y  $4\text{ }\mu\text{M}$ , respectivamente) [24, 71, 73]. Adicionalmente, también se demostró que las toxinas colocalizan con la ALP en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino de *M. sexta* [44].

En *H. virescens*, la cepa YHD2, resistente a Cry1Ac, además de la mutación en el gen de caderina, que causa del 40-80 % del fenotipo de resistencia [52], tiene mutaciones adicionales que son responsables del resto del fenotipo de resistencia, estas mutaciones afectan la producción de GPI-ALP, indicando que la ALP es un receptor funcional de Cry1Ac en *H. virescens* [37]. Adicionalmente, en *Ae. aegypti* se demostró que un fago-péptido que se une a una ALP de 65 kDa compite por la unión de la toxina Cry1Aa a las BBMV e inhibe la toxicidad de Cry1Aa en los bioensayos [74].

### ⊙ **Transportador ABCC2 (ABCC2).**

Los transportadores ABC (ATP binding cassette) son proteínas integrales de membrana que unen ATP y usan la energía de su hidrólisis para transportar sustratos a través de la membrana. En mamíferos e insectos se han descrito ocho subfamilias (A-H). Dentro de la subfamilia C se encuentra un subconjunto de transportadores ABC que posee un dominio adicional en el extremo N-terminal compuesto de 5 hélices transmembranales. Los miembros de este subconjunto son conocidos como proteínas resistentes a múltiples drogas (MRPs: Multidrug-resistant proteins); el transportador ABCC2 pertenece a este subconjunto. En mamíferos, ABCC2 se expresa predominantemente en órganos secretores y barreras fisiológicas como células epiteliales y se localiza en hígado, riñón e intestino. El transportador ABCC2 está involucrado en el transporte de iones y en la secreción de toxinas, esta proteína es capaz de transportar diferentes sustratos como xenobióticos, metales pesados y de conferir resistencia a antibióticos, drogas quimioterapéuticas y herbicidas. En insectos, el transportador ABC se ha implicado en el metabolismo de ácido úrico, desarrollo y la resistencia a insecticidas [22].

Los primeros estudios demostraron que la resistencia a toxinas Cry1A en algunas cepas de *H. virescens*, *T. ni*, *P. xylostella* y *B. mori* está ligada a mutaciones en un gen que codifica para el transportador ABCC2 y que, en algunos casos estas mutaciones tienen un efecto directo en la pérdida de unión de las toxinas a las BBMV's derivadas de estas cepas, esto indica que el transportador ABC podría ser un receptor de las toxinas [75-78].

Recientemente, Tanaka y colaboradores (2013) demostraron que, como se había propuesto anteriormente, el transportador ABCC2 es un receptor funcional de las toxinas Cry. En este estudio, los autores expresaron ectópicamente el transportador ABCC2 de *B. mori* (BmABCC2) en células Sf9. Las células transfectadas unen a las toxinas Cry1A y se vuelven susceptibles a las toxinas a diferencia de las células que no expresan al BmABCC2 [79].

### ⊙ **BTR-270.**

La proteína BTR-270 es un glicoconjugado de 270 kDa que se identificó en el lepidótero *L. dispar*, esta proteína aniónica altamente glicosilada une a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ba y Cry1Ac y no se une a Cry1Ca, Cry2Aa, Cry2Ba y Cry3Aa [38]. Se cree que esta proteína podría ser un componente del glicocalix de la membrana de las microvellosidades.

### ⊙ **P252.**

Esta proteína se aisló de la fracción soluble en Triton X-100 derivada de BBMV de *B. mori*. Mediante SDS-PAGE se estimó que tiene una masa molecular de 252 kDa. La proteína purificada se une a Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac bajo condiciones no desnaturizantes [80].

### ⊙ **$\alpha$ -amilasa.**

Mediante ensayos de *ligand blot*, Fernández-Luna y colaboradores identificaron una proteína de 70 kDa presente en las BBMV de *An. albimanus* que interactúa con las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa. Esta proteína se identificó como una  $\alpha$ -amilasa [81].

### ⊙ **ADAM-3.**

En el coleóptero *L. decemlineata* se observó la unión de la toxina Cry3Aa a una proteína de 30 kDa, identificada como la metaloproteasa ADAM-3. La unión de la toxina a ADAM-3 mejora la formación de poro de la toxina, sugiriendo que esta unión es importante para la toxicidad de Cry3Aa [82].

### ⊙ **β- glucosidasa**

Se demostró que la toxina Cry8Da se une a una sola proteína de 150 kDa en las BBMV's del coleóptero *P. japónica*. Esta proteína se identificó como una β-glucosidasa. Estas enzimas hidrolizan los enlaces glucosídicos β y están involucradas en la degradación de la celulosa, que es un componente estructural de la pared celular de las células vegetales.

### ⊙ **Glicolípidos**

La identificación de glicolípidos como posibles receptores de las toxinas Cry se realizó en el nematodo *C. elegans* al caracterizar mutantes resistentes a la toxina Cry5Ba [40, 83]. Estas mutantes son deficientes en la producción de ciertos glicolípidos basados en ceramida, a los cuales se une de manera específica la toxina Cry5Ba. También se observó que las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac se unen a glicolípidos extraídos del intestino de *M. sexta* [40].

### ⊙ **Moléculas de unión a toxina Cry identificadas mediante enfoques proteómicos**

Los enfoques proteómicos basados en geles de dos dimensiones (2D) y espectrometría de masas se han empleado para el descubrimiento de nuevas proteínas de unión a toxinas Cry. Con esta tecnología se identificó a la ALP como proteína de unión a la toxina Cry1Ac en *M. sexta* y *H. virescens* [71, 84] y posteriormente se validó como receptor funcional, ya que en *H. virescens* la pérdida de la enzima correlaciona con la resistencia a toxinas Cry [37].

Adicionalmente, se identificaron otras proteínas de unión a Cry1Ac en BBMV's de lepidópteros mediante *ligand blot* de geles de 2D, entre ellas: actina, aminopeptidasa, subunidad A de la ATPasa vacuolar y una proteína similar a la desmocolina (Tabla 2) [71, 84].



De igual manera, el análisis de proteínas de unión en BBMV de *Ae. aegypti* a Cry4Ba por espectrometría de masas reveló la unión de esta toxina a dos proteínas asociadas a balsas lipídicas: flotilina y prohibitina, así como a actina, ALP y APN (Tabla 2). Los datos anteriores sugieren que proteínas adicionales a las ya descritas así como proteínas intracelulares podrían tener un papel activo en el modo de acción de las toxinas Cry.

**Tabla 2. Proteínas de unión a toxinas Cry identificadas mediante análisis proteómicos**

Proteína	Insecto	Referencia
<b>V-ATPasa</b>	<i>H. virescens</i> (Subunidad A) <i>A. grandis</i> (Subunidad A) <i>H. armigera</i> (Subunidad B) <i>A. aegypti</i> (Subunidad E)	[84-87]
<b>Heat shock proteins</b>	<i>H. armigera</i> <i>A. grandis</i>	[85, 86]
<b>Actina</b>	<i>M. sexta</i> <i>H. virescens</i> <i>H. armigera</i> <i>A. aegypti</i>	[71, 84, 86, 87]
<b>ATP sintasa</b>	<i>A. aegypti</i>	[87]
<b>Flotilina</b>	<i>A. aegypti</i>	[87]
<b>Prohibitina</b>	<i>A. aegypti</i>	[87]

Los colores indican el orden al que pertenecen los insectos: lepidópteros (negro), dípteros (azul) y coleópteros (verde)

### Resistencia a toxinas Cry

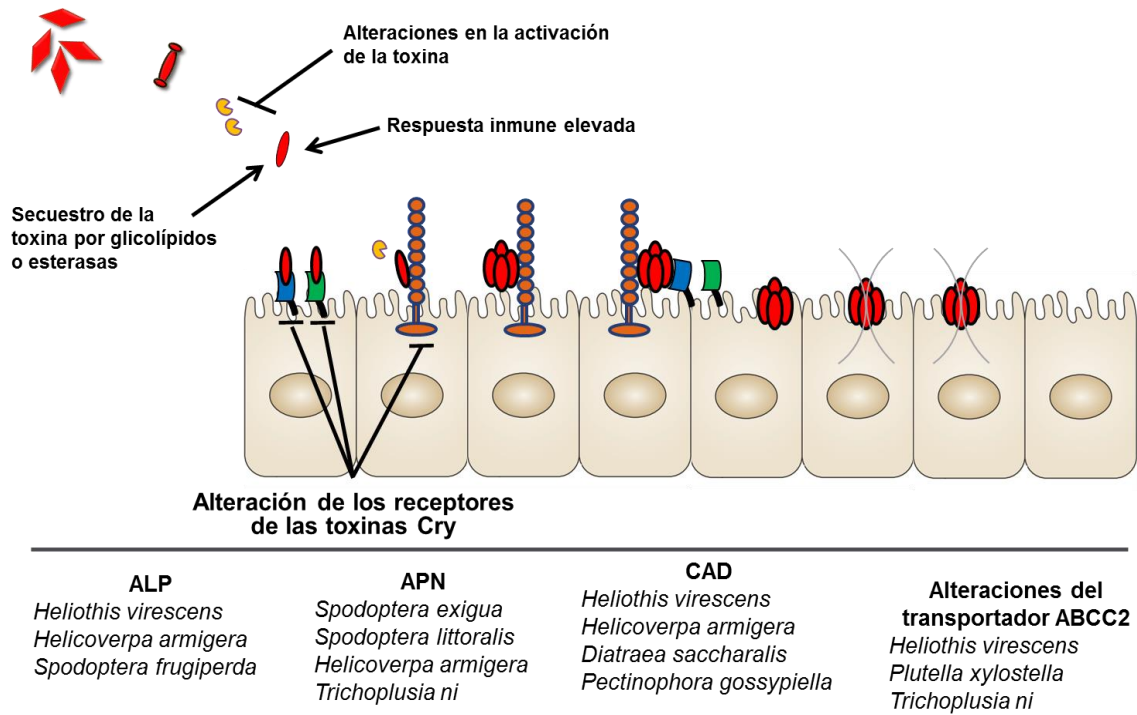
En la actualidad, se estima que alrededor de 170 millones de hectáreas de sembradíos a nivel mundial se dedican al cultivo de plantas transgénicas Bt (algodón y maíz). Sin embargo, el uso intensivo de esta tecnología ha generado una fuerte presión de selección en los insectos expuestos a las toxinas que está induciendo la rápida evolución de resistencia hacia las toxinas Cry.

El monitoreo global de ciertas plagas en campo indica que durante los primeros 15 años del empleo de plantas Bt, se ha generado resistencia a toxinas Cry en al menos 7 especies de insectos en campo:

- *H. zea*: aislada en Estados Unidos de cultivos de algodón que expresa la toxina Cry1Ac [88].
- *H. armigera*: Aislada en China de cultivos de algodón que expresa la toxina Cry1Ac [89].
- *P. gossypiella*: Aislada en India de sembradíos de algodón que expresa la toxina Cry1Ac [90].
- *S. frugiperda*: Aislada en Puerto Rico de sembradíos de maíz que expresa la toxina Cry1F [91].
- *Busseola fusca*: Aislada en Sudáfrica de sembradíos de maíz que expresa la toxina Cry1Ab [92].
- *H. armigera*: Aislada en Australia de cultivos de algodón que expresan a la toxina Cry2Ab.
- *D. virgifera virgifera*: Aislada en Estados Unidos de cultivos de maíz que expresa la toxina Cry3Bb1 [93].

Adicionalmente, también se ha desarrollado resistencia a formulaciones de Bt-Cry1A tóxicas en poblaciones de *P. xylostella* aisladas en campo abierto en Hawái y de aislados de *T. ni* en invernaderos en Canadá [94, 95].

En teoría, la resistencia a toxinas Cry se puede desarrollar por mutaciones que afecten cualquiera de los pasos del mecanismo de acción de las toxinas. De hecho, mediante el mapeo de mutaciones asociadas a fenotipos de resistencia de insectos aislados de campo y seleccionados en laboratorio se ha demostrado que la resistencia se puede generar por diferentes mecanismos, incluyendo la alteración de la activación de las toxinas [96], secuestro por lipoforina [97] o esterases [98], una respuesta inmune elevada [99] y por alteración de los receptores de la toxina, lo que resulta en una unión reducida de las toxinas a las membranas (figura 5) [100].



**Figura 5.** Mecanismos de resistencia a toxinas Cry. Modificado de [22]

El mecanismo de resistencia más frecuente involucra defectos en la unión de la toxina a sus receptores. En diferentes especies de insectos, este mecanismo se debe a mutaciones en receptores como caderina, ALP, APN o en el transportador ABC (Tabla 3).

**Tabla 3. Resistencia asociada a alteraciones en los receptores de las toxinas Cry**

Insecto	Cepa	Toxina a la que es resistente	Bases genéticas de la resistencia	Ref.
<i>P. xylostella</i>	NO-QAGE	Cry1Ac	Pérdida de 30 pb en el gen que codifica para el transportador ABCC2	[75]
<i>O. nubilalis</i>	SKY	Cry1Ab	Cambio de dos aminoácidos en la APP	[101]
<i>D. saccharalis</i>	Bt-RR	Cry1Ab	Expresión reducida de caderina y tres APNs	[102, 103]
<i>H. armigera</i>	GYBT	Cry1Ac	Se introduce un codón de paro prematuro en el gen de CR	[104]

	BtR	Cry1Ac	Pérdida en el gen de APN1 y reducción en los niveles del transcrito de mALP	[105, 106]
<b>H. virescens</b>	YFO	Cry1Ac	Mutaciones en el gen de CR	[76]
	YEE	Cry1Ac	Pérdida de 22 pb en el gen del transportador ABCC2	[76]
	YHD3	Cry1Ac	Pérdida de 22 pb en el gen del transportador ABCC2 y mutaciones en el gen de CR	[76]
	YHD2	Cry1Ac	Interrupción del gen de CR por un retrotransposon y reducción en los niveles de ALP	[37, 52]
<b>P. gossypiella</b>	AZP-R	Cry1Ac	Mutaciones en tres alelos de CR	[53]
<b>T. ni</b>	GipBtR	Cry1Ac	Mutación en el transportador ABCC2 y reducción en la expresión de APN1	[107, 108]
	GLEN-Cry1Ac-BCS	Cry1Ac	Pérdida de 30 pb en el gen que codifica para el transportador ABCC2 y reducción en la expresión de APN1	[75, 107]
<b>S. exigua</b>	Cry1C-resistente	Cry1Ca	No se expresa la APN1	[68]
<b>S. frugiperda</b>	456 y 512	Cry1Fa	Reducción en los niveles del transcrito de mALP	[106]
<b>B. mori</b>	C2	Cry1Ab	Mutación de un aminoácido en el transportador ABCC2	[77]

ALP (Fosfatasa alcalina), APN (aminopeptidasa N), APP (Aminopeptidasa P), CR (Caderina) y Transportador ABC (ABCC2).

### **Estrategias para contender con la resistencia**

La resistencia a cultivos Bt es un problema emergente que pone en riesgo el empleo de esta tecnología en un futuro, por ello se han descrito e implementado diversas estrategias para contender con la evolución de la resistencia. A continuación se describen algunas de ellas [109]:

### ⊙ **Dosis altas y refugio**

Esta estrategia implica el uso de cultivos Bt que expresen altas concentraciones de toxinas Cry y la siembra de refugios de cultivos no transgénicos cercanos a los sembradíos de Bt. Los refugios están destinados a mantener poblaciones de insectos susceptibles a las toxinas. En teoría, esta estrategia retrasaría la evolución de resistencia si insectos homocigotos resistentes (RR) se cruzan con homocigotos susceptibles (SS) y su descendencia heterocigota (RS) se elimina por la alta concentración de toxinas expresadas en los cultivos Bt.

### ⊙ **Plantas Bt con nuevas toxinas Cry**

Además de las toxinas Cry de 3 dominios, otras toxinas Cry (Bin, Cyt, Mtx y Vip) son producidas por diversas cepas de Bt, éstas no comparten similitud de secuencia con las toxinas Cry 3D, por lo que se ha propuesto que tienen un mecanismo de acción distinto y por lo tanto, podrían ser capaces de controlar insectos resistentes a las toxinas Cry 3D [6, 110].

### ⊙ **Toxinas Cry modificadas**

Como se mencionó previamente, de acuerdo al modelo de unión secuencial, la unión de las toxinas Cry1A a los receptores de tipo caderina facilita el corte proteolítico de la hélice  $\alpha$ -1, induciendo la oligomerización de la toxina y la formación del poro. Con base en estas observaciones, se generaron toxinas Cry modificadas (Cry1AbMod y Cry1AcMod) que carecen de la hélice  $\alpha$ -1 [111]. Estas toxinas son capaces de oligomerizar e insertarse en la membrana de manera independiente al receptor de tipo caderina. Las toxinas Cry1AMod son activas contra insectos en los cuales se silenció la caderina mediante RNAi y por ello se volvieron tolerantes a las toxinas Cry. Adicionalmente, también son activas contra una cepa de *P. gossypiella* que desarrolló resistencia en campo a las toxinas debido a deleciones en el gen de caderina. A pesar de que se creía que estas toxinas sólo eran activas contra insectos en los que los mecanismos de resistencia

involucran defectos en el receptor de caderina, recientemente se demostró la eficacia de las toxinas Cry1AMod contra dos cepas resistentes aisladas en campo: *P. xylostella* y *O. nubilalis*, en las cuales la resistencia no está ligada a mutaciones en el gen de caderina [54]. Adicionalmente, también se demostró que estas toxinas son activas contra cepas de *P. xylostella* y *T. ni* con mutaciones en el transportador ABCC2 [75, 108].

### ⊙ **Apilamiento de genes**

Otra de las estrategias implementadas para contender con la evolución de resistencia es el apilamiento de genes, que consiste en expresar dos o más toxinas en una misma planta.

Debido a que la alteración de los receptores es el mecanismo de resistencia a toxinas Cry más frecuente, las toxinas coexpresadas en estas plantas transgénicas se deben unir a diferentes receptores [112]. De esta manera, la probabilidad de generar resistencia a las toxinas disminuye, ya que se requerirían múltiples mutaciones para perder susceptibilidad a ambas toxinas.

Existen varios reportes en la literatura en los que se observa que algunos insectos en los que se selecciona resistencia contra una toxina en específico también generan resistencia a otras toxinas Cry a las que nunca han sido expuestos. A este fenómeno se le conoce como resistencia cruzada y es común entre toxinas que además de presentar alta similitud de secuencia también comparten los mismos receptores. Es por ello, que la selección de la combinación de toxinas que sean activas contra la misma plaga pero que se unan a diferentes receptores (y en consecuencia no generen resistencia cruzada entre ellas) es uno de los principales desafíos para la implementación de esta tecnología.

# ANTECEDENTES

Actualmente se comercializan algunas plantas transgénicas de segunda generación que han comenzado a implementar la estrategia de apilamiento de genes. La más empleada hasta el momento es la planta transgénica de algodón Bollgard II, que constituye aproximadamente el 80 % del total de sembradíos de algodón en Australia.

Bollgard II coexpresa a las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab. Ambas toxinas pertenecen a la familia de toxinas Cry de tres dominios, sin embargo, comparten sólo 17 % de identidad de secuencia.

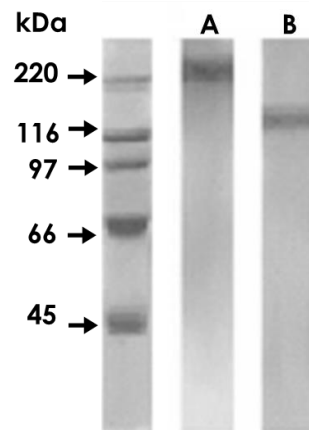
El empleo de esta combinación de toxinas obedece al hecho de que no comparten los mismos sitios de unión, por lo que el algodón Bollgard II debería ser tóxico contra insectos resistentes a Cry1Ac o Cry2Ab. De hecho, recientemente se demostró que varias cepas de *H. armigera* que desarrollaron resistencia a Cry1Ac en campo, seguían siendo susceptibles a Cry2Ab [89]. Adicionalmente, mediante bioensayos en invernadero, se observó que una cepa de *P. gossypiella* resistente a Cry1Ac era sensible a algodón transgénico que coexpresaba Cry1Ac en combinación con Cry2Ab [113].

Aunado al control de insectos resistentes que proporciona la coexpresión de Cry1Ac y Cry2Ab, esta combinación de toxinas aumenta el espectro de toxicidad, ya que Cry2Ab es activa contra algunos lepidópteros que no son susceptibles a Cry1Ac.

## **Receptores de la toxina Cry2Ab**

A pesar del uso extensivo de Bollgard II, a la fecha, no se ha reportado ningún receptor para la toxina Cry2Ab, a diferencia de Cry1Ac (Tabla 1). Sólo se sabe que su homólogo Cry2Aa se une a una proteína de 240 kDa en las BBMV de *H.*

*armigera* y otra de 130 kDa en *Spodoptera littoralis* (figura 6) [114]. Sin embargo, se desconoce la identidad de estas proteínas.

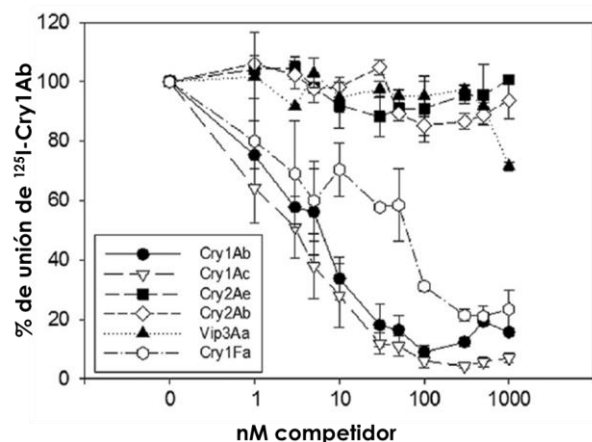


**Figura 6.** Ligand blot de Cry2Aa a BBMVs de *H. armigera* (A) y *S. littoralis*. Modificada de [114].

A pesar de que se desconocen los receptores de Cry2Ab, se ha propuesto que éstos son distintos a los receptores de Cry1Ab. La forma en que se evalúa si dos toxinas se unen a los mismos sitios es mediante ensayos de competencia heteróloga de unión. Los ensayos de competencia heteróloga de unión consisten en unir a una toxina marcada con biotina o  $I^{125}$  a BBMVs en presencia de un exceso de competidor (toxina no marcada o fría). Si la toxina fría (Cry1Ac:  $\nabla$  figura 7) se une a los mismos receptores que la toxina marcada ( $I^{125}$ -Cry1Ab, figura 7), entonces será capaz de desplazar la unión de la toxina marcada, en cambio, si la toxina fría (Cry2Ab:  $\diamond$  figura 7) no se une a los mismos receptores, la unión de la toxina marcada no se verá afectada.

En la figura 7 se observa que Cry1Ab compite por la unión a BBMVs de *H. zea* con Cry1Ac y Cry1Fa. Lo anterior sugiere que estas toxinas no se unen a los mismos sitios que Cry1Ab. De igual manera, se han reportado varios estudios en los que se demuestra que las toxinas Cry1A y Cry2A no comparten los mismos sitios de unión en diversos insectos (Tabla 4).





**Figura 7.** Competencia heteróloga de unión a BBMVs de *H. zea* entre  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab y Cry1Ac, Cry2Ae, Cry2Ab, Vip3Aa y Cry1Fa. Tomada de [115].

**Tabla 4. Ensayos de competencia heteróloga de unión a BBMVs**

Toxina unida	Competidor		Insecto	Ref.
	Compite	No compite		
<b>Cry1Ab</b>	Cry1Aa, Cry1Ac* y Cry1Ja	Cry1Ba, Cry1Ca, Cry2Aa y Cry9Ca	<i>P. gossypiella</i>	[116]
<b>Cry2Ab</b>	Cry2Aa y Cry2Ae	Cry1Ac*	<i>H. armigera</i>	[117]
<b>Cry2Ab</b>		Cry1Ac*	<i>H. punctigera</i>	
<b>Cry1Ac</b>		Cry2Ab* y Cry2Ae	<i>H. punctifera</i>	[118]
<b>Cry1Ab</b>	Cry1Aa* y Cry1Ac*	Cry2A*	<i>C. medinalis</i> y <i>M. patnalis</i>	[119]
<b>Cry1Ab</b>		Cry1Ia, Cry2Aa, Cry2Ab y Cry9Ca	<i>L. bostrana</i>	[120]
<b>Cry1Aa</b>	Cry1Ab* y Cry1Ac*	Cry2A*	<i>P. gossypiella</i> y <i>H. zea</i>	[121]
<b>Cry1Ab</b>	Cry1Ac y Cry1Fa	Cry2Ab, Cry2Ae*, Vip3Aa y Cry2Ae*	<i>H. zea</i>	[115]
<b>Cry1Ab</b>		Cry2Ae*	<i>H. armigera</i> y <i>H. virescens</i>	
<b>Cry1Ac</b>		Cry2Aa	<i>H. armigera</i>	[122]

Algunas toxinas que se emplearon como competidores (\*), posteriormente se marcaron, se unieron a las BBMVs y se compitieron con otras toxinas.

En 2010, Caccia y colaboradores [118] demostraron que en dos cepas de *H. armigera* y *H. punctifera*, la resistencia generada contra Cry2Ab se debía a una disminución en la unión de esta toxina a las BBMV. El hecho de que estas cepas sean susceptibles a Cry1Ac, y que la unión de esta toxina no esté afectada, sugiere que el mecanismo de resistencia desarrollado por el insecto involucra defectos en un receptor específico para Cry2Ab, que no es necesario para Cry1Ac. Este estudio, al igual que los presentados en la tabla 4, refuerza la hipótesis de que los receptores de las toxinas Cry2A son distintos a los de las toxinas Cry1A.

### Resistencia cruzada entre toxinas Cry1 y Cry2.

Dado que el mecanismo de resistencia más frecuente es la alteración de los receptores de las toxinas, si éstas (Cry1A y Cry2A) no se unen a los mismos receptores, entonces se espera que no se genere resistencia cruzada entre Cry1A y Cry2A. Este supuesto se ha comprobado en diversos estudios (Tabla 5) en los que la selección con Cry1A no genera resistencia a Cry2A y viceversa.

**Tabla 5. Estudios de resistencia cruzada entre toxinas Cry1A y Cry2A**

Insecto	Cepa	Toxina con la que se seleccionó	Resistencia cruzada	No hay resistencia cruzada	RR	Ref.
<i>D. saccharalis</i>	Cry1Ab-RR	Cry1Ab	Cry1Aa y Cry1Ac	Cry2Ab y Cry1A.105		[123]
<i>H. armigera</i>	SP15	Cry2Ab	Cry2Aa y Cry2Ae	Cry1Ac y Cry1Ab		[118, 124]
<i>H. armigera</i>	GYBT	Cry1Ac	Cry1Aa y Cry1Ab	Cry2Aa		[104]
<i>H. armigera</i>	BtR	Cry1Ac		Cry2Ab		[125]
<i>H. armigera</i>	LFR <sub>10</sub>	Cry1Ac		Cry2Ab		[125]
<i>H. armigera</i>	---	Cry1Ac		Cry2Ab		[126]
<i>H. armigera</i>	BX	Cry1Ac	Cry1Ab	Cry2Ab y Cry2Aa		[127]
<i>H. armigera</i>	SCD-r1	Cry1Ac	Cry1Aa y Cry1Ab	Cry2Aa		[128]
<i>H. punctigera</i>	Hp4.13	Cry2Ab	Cry2Ae	Cry1Ab y Cry1Ac		[118]
<i>H. zea</i>	AR	Cry1Ac	Cry1Ab	Cry2Aa y		[129]

Vip3					
<b>H. zea</b>	GA-R	Cry1Ac		Cry2Ab	[130]
<b>H. zea</b>	---	Cry1Ac	Cry2Aa		3.3 [131]
<b>H. virescens</b>	CP73-3	Cry1Ac	Cry2A Cry1Ab		52.8 [132]
<b>H virescens</b>	KCBhyb	Cry2Aa	Cry1Ac		187.67 [133]
<b>H. virescens</b>	CXC	Cry2Aa	Cry1Ac		289.31 [133]
<b>H virescens</b>	YHD2	Cry1Ac	Cry2A		15 [134]
<b>H virescens</b>	YHD2 1000MVP	Cry1Ac	Cry2Aa		9.5 [135]
<b>P. gossypiella</b>	AZP-R	Cry1Ac	Cry2Ab		1.8 y 1.9 [136]
<b>P. gossypiella</b>	BX-R1	Cry2Ab	Cry1Ac		420, 180 [136]
<b>P.gossypiella</b>	BX-R2	Cry2Ab	Cry1Ac		2.6, 21 [136]
<b>P. xylostella</b>	SZBT	Cry1Ac	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1F y Cry1C	Cry2Aa y Cry1B	[137]
<b>Ti. ni</b>	GLEN- Cry1Ac- BCS	Cry1Ac	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry9C, Cry1J, Cry1F, Cry1E, Cry1C y Cry1Bb	Cry2Ab, Cry1D	[78]

Se determinó que existe resistencia cruzada en los casos en los que el aumento en la dosis letal media (LC<sub>50</sub>) de la cepa resistente con respecto a la cepa susceptible es significativo. Es decir, no se sobrelapan los límites de confianza (95 %). El cociente de resistencia (RR: resistance ratio) es la LC<sub>50</sub> de la cepa resistente dividido por la LC<sub>50</sub> de la cepa susceptible.

En un estudio no listado en la tabla se demostró que dos cepas de *P. gossypiella* seleccionadas con Cry1Ac (APHIS-98R y AZP-R) tienen 0 % de sobrevivencia al retarse con 10 µg/g de dieta de Cry2Aa [138]. Sin embargo, en un bioensayo en el que se retó a tres cepas de *P. gossypiella* resistentes a Cry1Ac (MOV-97R, AZP-RO y AZP-RE) con 1 µg/mL de Cry2Aa, las tres cepas tuvieron 7.1, 10 y 5.1 % de sobrevivencia, respectivamente. Pero, al retarse con 3.2 µg/mL de Cry2Aa la sobrevivencia fue nula. De igual manera, se observó que la cepa AZP-RO es susceptible a algodón que expresa Cry2Ab (0 % de sobrevivencia) o Cry1Ac más Cry2Ab (0 % de sobrevivencia). Aunque, al repetir el experimento,

obtuvieron 1.8 % (SD 1.2) de sobrevivencia en algodón que coexpresa Cry1Ac y Cry2Ab [113]. En dos estudios independientes se observó que al retar a una cepa de *P. xylostella* (NO-QA) con una toxina a la que no había sido expuesta (Cry2A) la mortalidad disminuía hasta en un 60 % [139, 140].

Finalmente, existen dos reportes en los que se aislaron varias cepas de campos de cultivo de algodón que expresa Cry1Ac en China y se observó que estas cepas han desarrollado resistencia a Cry1Ac, sin embargo, presentan poca o nula resistencia a Cry2Ab [89, 141].

La tendencia de todos estos trabajos es que la selección con una toxina (Cry1A o Cry2A) genera poca ( $RR < 15$ ) o nula resistencia a la otra toxina, lo cual apoya el empleo de esta combinación de toxinas para contender con la generación de resistencia y fortalece la propuesta de que se unen a diferentes receptores. Sin embargo, en algunos casos sí se desarrollan altos niveles de resistencia entre ambas toxinas; a pesar de ello, las evidencias sugieren que los mecanismos de resistencia no implican defectos en la unión o bien, que se han desarrollado al menos dos mecanismos de resistencia distintos como a continuación se describe.

El nivel más alto de resistencia cruzada entre Cry2Ab y Cry1Ac se observó en la cepa BX-R1 de *P. gossypiella* resistente a Cry2Ab. Esta cepa desarrolló un RR de 420 contra Cry1Ac. Sin embargo, al seleccionar *P. gossypiella* con Cry1Ac (AZP-R), los niveles de resistencia generados contra Cry2Ab fueron mucho menores ( $RR = 1.9$ ). A este fenómeno se le denominó resistencia cruzada asimétrica y aunque aún se desconocen las bases moleculares de este fenómeno, considerando que estas dos toxinas no compiten por los mismos sitios de unión, se ha propuesto que la resistencia cruzada entre Cry1Ac y Cry2Ab requiere de alelos de resistencia en dos o más *locus*. Finalmente, la cepa BX-R1 no sobrevivió al exponerse a algodón transgénico que coexpresa Cry1Ac y Cry2Ab, por lo que las condiciones de selección de resistencia y bioensayos en laboratorio no son totalmente extrapolables a ensayos en campo [136].

*H. virescens* es otro de los insectos en los que se han observado altos niveles de resistencia cruzada entre toxinas Cry1A y Cry2A. La cepa CP73-3 resistente a Cry1Ac desarrolló un nivel de resistencia de 52.8 contra Cry2A [132], mientras que las cepas KCBhyb y CXC resistentes a Cry2Aa presentan un RR contra Cry1Ac de 187.7 y 289.3 respectivamente [133].

En la cepa CP73-3 el mecanismo de resistencia no está asociado a la disminución de la unión de las toxinas, sin embargo, se ha encontrado que en esta cepa, al igual que en CXC, la actividad de proteasas está alterada; además, la recuperación del epitelio intestinal ante el reto con Cry1Ac es mayor en esta cepa con respecto a la susceptible. La cepa CXC de *H. virescens* proviene de una cruce de CP73-3 (resistente a Cry1Ac) con larvas susceptibles. La progenie de esta cruce se seleccionó con Cry2Aa. Mediante bioensayos se demostró que esta cepa aumentó sus niveles de resistencia a Cry2Aa así como a Cry1Ac, lo anterior sugiere que el mecanismo de resistencia a Cry2Aa es el mismo que el de Cry1Ac. Sin embargo, la unión de Cry1Ac y Cry2Aa no está afectada, por lo que se propuso que el mecanismo que confiere resistencia a ambas toxinas no involucra defectos en la unión, sino que está relacionado con la alteración de algún paso en común en el modo de acción de las toxinas.

El origen de la cepa KCBhyb es similar al de CXC, proviene de una cepa resistente a Cry1Ac (KCB), sin embargo, la selección con Cry2Aa no aumentó los niveles de resistencia a Cry1Ac. Lo anterior sugiere que la resistencia se debe a dos mecanismos distintos.

### **Alelos ligados a resistencia**

Hay múltiples ejemplos en la literatura en los que se reporta que la resistencia a toxinas Cry está asociada a mutaciones en los genes de algunos receptores de las toxinas así como en elementos trans-regulatorios. Combinando esta información (tabla 3) con los datos de resistencia cruzada entre toxinas Cry1 y

Cry2 (tabla 5) podemos hacer algunas inferencias acerca de los receptores que podrían o no estar implicados en el mecanismo de acción de las toxinas Cry2A.

En *D. saccharalis* (Bt-RR), *H. armigera* (GYBT y BtR) y *T. ni* (GLEN-Cry1Ac-BCS) no se desarrolló resistencia cruzada entre toxinas Cry1A y Cry2A (tabla 5). En estas cepas la resistencia está asociada a:

Bt-RR (Cry1Ab): reducción en la expresión de caderina y tres isoformas de APN [102, 103].

GYBT (Cry1Ac): se introduce un codón de paro prematuro en el gen que codifica para la caderina [104].

BtR (Cry1Ac): pérdida del gen de APN1 y reducción de los niveles del transcrito de mALP [105, 106].

GLEN-Cry1Ac-BCS (Cry1Ac): pérdida de 30 pb en el gen que codifica para el transportador ABCC2 y reducción en la expresión de APN1 [75, 107].

Con la correlación de estos datos y el antecedente de que las toxinas Cry1A y Cry2A no se unen a los mismos sitios, podemos suponer que la APN1, mALP y la caderina no juegan un papel importante en el mecanismo de acción de las toxinas Cry2.

Sin embargo, existen dos trabajos que sugieren que mutaciones en caderina y ALP podrían tener cierta influencia en la toxicidad de Cry2A:

La cepa AZP-R de *P.gossypiella*, resistente a Cry1Ac, tiene un RR a Cry2Ab de 1.9. En esta cepa, se encontró que la resistencia está ligada genéticamente a mutaciones en tres alelos del gen de caderina [53].

En *H. virescens*, la cepa YHD2 desarrolló un nivel de resistencia de 15 entre Cry1Ac y Cry2A. Mediante un análisis genético se descubrió que el gen de caderina está interrumpido por un retrotransposón, lo que previene la traducción de la proteína completa. De hecho, la caderina no se detecta por inmunodetección. Adicionalmente, también se describió que la resistencia a Cry1Ac está ligada a la disminución de la expresión de ALP [37, 52].

Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo nos propusimos evaluar la interacción de Cry2Ab con los receptores de Cry1Ab (ALP, APN1 y caderina) así como determinar los blancos de unión de esta toxina en el lepidóptero *M. sexta*.

# HIPÓTESIS

Las toxinas Cry1Ab y Cry2Ab se unen a diferentes receptores en la membrana de las microvellosidades apicales del intestino de larvas de *Manduca sexta*.

## OBJETIVO GENERAL

Identificar los receptores a los que se une la toxina Cry2Ab en vesículas de membrana de microvellosidad apical (BBMVs) de larvas de *M. sexta*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar si la toxina Cry2Ab compite con la toxina Cry1Ab por los mismos sitios de unión en BBMVs.
- Evaluar la interacción de Cry2Ab con los receptores de Cry1Ab en *M. sexta* (ALP, APN1 y caderina).
- Identificar los receptores a los que se une Cry2Ab en BBMVs de *M. sexta*.



# MATERIALES Y MÉTODOS

## Cepas bacterianas y medios de cultivo

### Cepas de *Bacillus thuringiensis*

La cepa acristalífera Bt 407- se transformó con el vector pHT315-Cry1Ab. Las colonias transformantes se crecieron en medio de esporulación HCT adicionado con eritromicina (10 µg/mL) por 72 horas a 30 °C.

La cepa de Bt que expresa Cry2Ab (Bt2Ab, donada por el Dr. Bruce Tabashnik) se creció en medio LB, HCT y SP adicionado con tetraciclina (10 µg/mL) por 24, 48 y 72 horas a 30 °C.

### Cepas de *Escherichia coli*

*E. coli* BL21 se transformó con las siguientes construcciones:

\* CR7-12/pET22b: Repetidos 7 al 12 del receptor de caderina de *M. sexta* clonados en el vector pET22b.

\* ALP/pET22b: gen completo de la ALP de *M. sexta* clonado en el vector pET22b.

Las células transformantes se crecieron en medio LB adicionado con ampicilina (100 µg/mL).

## Purificación de toxinas Cry

Las cepas de Bt se esporularon en los medio de cultivo indicados. La esporulación y formación de cristales se observó mediante microscopía de contraste de fases. La espora/cristal se recuperó en 30 mL de una solución que contenía 0.3 M de NaCl y 0.01 M de EDTA a pH 8. La suspensión se centrifugó por

10 minutos a 12 850 x g y se descartó el sobrenadante. Este lavado se repitió 3 veces. Después del tercer lavado, la pastilla se resuspendió en 30 mL de agua con 1 mM de PMSF. Este paso se repitió 3 veces. Finalmente, la pastilla se resuspendió en Tris 50 mM pH 8, PMSF 1mM y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

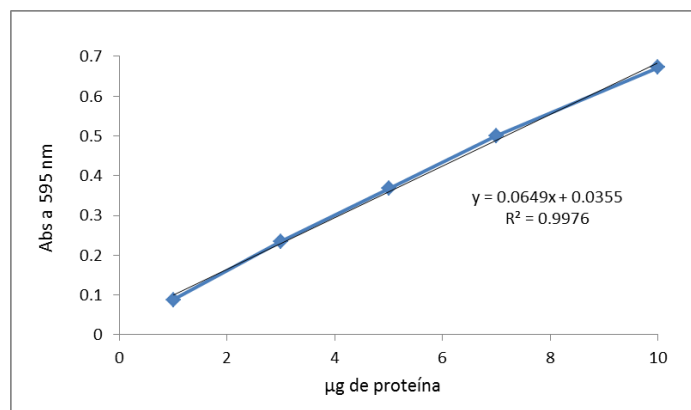
**Solubilización de protoxinas:** Para llevar a cabo la solubilización de los cristales de Cry2Ab, la preparación de espora/cristal se centrifugó 5 minutos a 11 228 x g y la pastilla se resuspendió en un volumen de NaOH 50 mM. Se incubó por una hora a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y pasado este tiempo se centrifugó 10 minutos a 11 228 x g (2 veces) para bajar la espora y los cristales no solubilizados, se recuperó el sobrenadante (protoxina soluble). En el caso de Cry1Ab, la solubilización se llevó a cabo en amortiguador de carbonatos 50 mM pH 10.5 y 0.2 % de  $\beta$ -mercaptoetanol a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por dos horas en agitación (850 rpm).

**Activación:** La protoxina soluble se diluyó 1:3 en Tris 1 M pH 8 para ajustar el pH del amortiguador, y se incubó a una relación 1:1 (Cry2Ab) y 1:20 (Cry1Ab) con tripsina por 1 hora a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en agitación (850 rpm). La reacción se detuvo con 1 mM de PMSF. Las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 12 100 x g y se recuperó el sobrenadante.

## **Cuantificación de proteínas**

### Método de Bradford

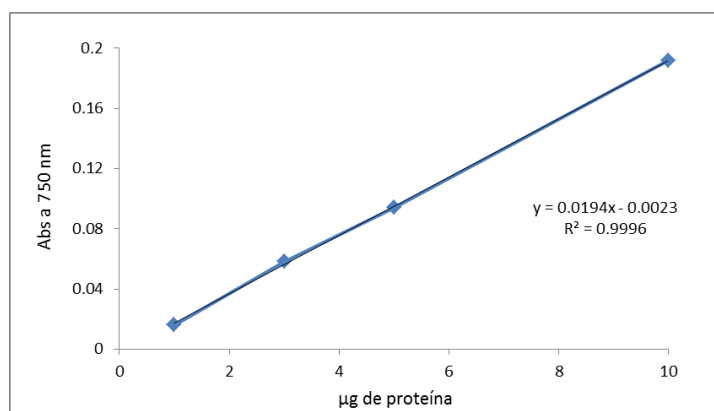
Para determinar la concentración de proteína se realizó un microensayo empleando el reactivo Bio-Rad Protein Assay, Dye Reagent Concentrate. Los datos se interpolaron a una curva estándar de proteína (figura 8), la cual se realizó empleando de 1 a 10  $\mu\text{g}$  de BSA.



**Figura 8.** Curva estándar de concentración de proteína realizada por el método de Bradford.

### Método de Lowry

Este método se empleó para determinar la concentración de proteínas de membrana. Se empleó el kit comercial BioRad Dc Protein Assay. Se realizó una mezcla 50:1 de los reactivos A y S (solución I). La solución I (125 µL) se mezcló con 3 µL de la muestra y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Se adicionó 1 mL del reactivo B y se mezcló. La reacción se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y al final se leyó la absorbancia a 750 nm. Para determinar la concentración de proteína los datos se interpolaron a una curva estándar generada con BSA (figura 9).



**Figura 9.** Curva estándar de concentración de proteína realizada por el método de Lowry.

## **Generación de anticuerpos policlonales**

La protoxina Cry2Ab soluble se separó en un gel SDS-PAGE preparativo y se cortó la banda correspondiente a la protoxina (~ 65 kDa). La banda se disolvió en PBS empleando un mortero. Esta muestra se utilizó para inmunizar un conejo junto con adyuvante incompleto de Freud o alúmina. Después del cuarto refuerzo se sangró a blanco. El suero se obtuvo al separar el paquete celular mediante centrifugación.

## **Inmunodetección (*Western blot*)**

Las muestras de proteínas se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida (12.5 %) bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon durante 12 horas con amortiguador t-PBS (PBS más 0.1 % de Tween 20) adicionado con 5 % de leche. Posteriormente se lavó la membrana con t-PBS y se incubó con el anticuerpo primario por una hora en agitación. La membrana se lavó por 30 minutos con amortiguador tPBS y se incubó otra hora con el anticuerpo secundario (GAR-HRP: Goat anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase de Santa Cruz Biotechnology) y se lavó por 30 minutos con tPBS. La inmunodetección se realizó utilizando el kit de quimioluminiscencia SuperSignal West Pico de Pierce.

## **Bioensayos**

Los bioensayos se realizaron con larvas neonatas de *M. sexta* por el método de contaminación de superficie. La dieta artificial de los insectos se colocó en placas de 24 pozos (2 cm<sup>2</sup> por pozo). Cada pozo se contaminó con 35 µL de protoxina o toxina Cry2Ab soluble diluida en agua y se dejó secar a temperatura ambiente. En cada pozo se colocó una larva. Las placas se dejaron a temperatura ambiente por 7 días y, transcurrido este tiempo, se contaron las larvas muertas. Como control negativo la dieta se contaminó con agua y/o hidróxido de sodio

(NaOH), de acuerdo a la concentración de protoxina más alta empleada en el bioensayo. La  $LC_{50}$  se estimó con un análisis PROBIT utilizando el programa POLO-PC. El análisis PROBIT es un tipo de regresión empleada para analizar variables de respuesta bimodal. Transforma la curva sigmoidea de dosis/respuesta a una línea recta, a partir de la cual se puede comparar la relación entre la variable de respuesta bimodal y la variable independiente (concentración de toxina).

### **Aislamiento de intestinos de *M. sexta***

Las larvas de tercer instar de *M. sexta* se colocaron sobre hielo por 30 minutos. Se realizó un corte longitudinal en la sección media de la larva y se extrajo el intestino medio. Se eliminó el contenido del intestino y el tejido se enjuagó en solución I (300 mM de manitol, 17 mM de Tris-HCl, 5 mM de EGTA, 1 mM de EDTA, 10 mM de HEPES, 2 mM de DTT, 1 mM de PMSF, leupeptina 10 µg/mL, pepstatina 10 µg/mL y 10 µg/mL de neomicina a pH 7.4). El tejido se lavó cuatro veces con la solución antes mencionada; al final se centrifugó a 2 320 x g durante 15 minutos y la pastilla se almacenó a -70 °C.

### **Preparación de BBMV**

Los intestinos de *M. sexta* se resuspendieron 1:10 p/v en solución I fría. Las muestras se homogenizaron utilizando un taladro Black & Decker U-114 tipo FV. Se dieron 9 golpes a 2250 rpm. Se agregó un volumen de  $MgCl_2$  24 mM y se dejó en hielo por 15 minutos. La muestra se centrifugó a 2 500 x g durante 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 30 000 x g durante 30 minutos a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en solución I fría y  $MgCl_2$  24 mM en relación 1:1. Se repitieron los pasos de centrifugación y al final la pastilla se resuspendió en solución I fría, diluida con agua desionizada (1:1) y se volvió a homogenizar, dando 3 golpes a 2250 rpm.

## Rasurado de BBMV's con PI-PPLC

Las BBMV's se lavaron dos veces con solución I, ultracentrifugando las muestras a 150 000 x g. Después del último lavado las BBMV's se resuspendieron al mismo volumen del inicial de solución I. Se agregó 1 U de PI-PLC (Phospholipase C, Phosphatidylinositol-specific from Bacillus cereus de Sigma) por cada 100 µg de BBMV's y se incubó por 2h a 37 °C. Al final, la reacción se centrifugó a 215 000 x g por 30 minutos y se recuperó el sobrenadante.

## Actividad de fosfatasa alcalina

Se incubaron 20 µg de proteína por 15 minutos con 500 µL de la siguiente solución: p-nitrofenol fosfato (1mg/mL) en 0.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de Tris-HCl pH 9.5 La reacción se detuvo con 500 µL de EDTA 250 mM pH 8. La absorbancia se leyó a 405 nm. Simultáneamente se realizó una curva estándar con 10, 20, 40 y 80 µM de p-nitrofenol (figura 10). La actividad enzimática específica se calculó de la siguiente manera: la cantidad de moles consumidos se obtuvo al interpolar los datos en la curva estándar y se dividió por el tiempo de reacción. Finalmente, se dividió por la cantidad de miligramos empleados. La actividad se reporta en unidades: una unidad se define como la cantidad de miligramos de proteína necesarios para transformar 1 nmol de p-nitrofenol fosfato en 1 minuto.

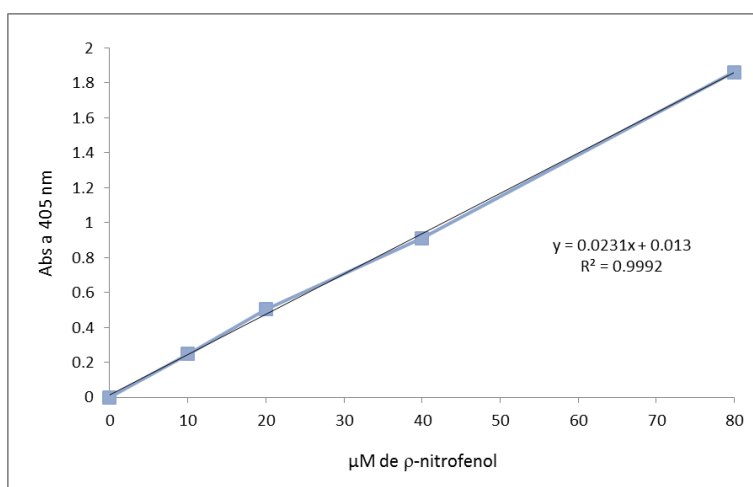


Figura 10. Curva estándar de p-nitrofenol.

## **Actividad de aminopeptidasa**

Se realizó la siguiente mezcla de reacción: 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , 200  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 1 M pH 8, 250  $\mu\text{L}$  de NaCl 1 M y 5  $\mu\text{L}$  de muestra. Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de L-leucina- $p$ -nitroanilida 10 mM. La cinética de reacción se siguió por 5 minutos, leyendo la absorbancia a 405 nm. Se obtuvo el cambio de absorbancia por minuto para calcular los nmoles de sustrato consumidos con respecto al tiempo. El resultado se dividió entre los  $\mu\text{g}$  de proteína empleados y se reportó como unidades (1U =  $\text{nmol}/\text{min} \cdot \mu\text{g}$ ).

## **Marcaje de proteínas con biotina**

Las toxinas se dializaron en amortiguador de boratos (ácido bórico 0.05 M, NaOH 0.05 M, NaCl 0.15 M pH 8.6 ajustando con HCl). La toxina dializada se incubó con un éster de biotina por 1 hora a temperatura ambiente (por cada 0.5 mg/mL de proteína a marcar se agregaron 20  $\mu\text{L}$  del reactivo de biotilación). La biotina libre se eliminó al pasar la toxina marcada por una columna empacada con 1 g de sephadex G25 (Sigma), previamente equilibrada con PBS. La columna se centrifugó a 514 x g por 2 minutos y se recuperó la elución.

## **Ensayos de unión en solución**

Se incubaron 10  $\mu\text{g}$  de BBMV's con diferentes concentraciones de toxina biotilada en 100  $\mu\text{L}$  de amortiguador de unión [PBS (pH 7.6), 0.1% (w/v) BSA, 0.1% (v/v) Tween 20] por una hora a temperatura ambiente. La toxina no unida se removió por centrifugación, 10 minutos a 14 000 g. Las BBMV's se lavaron 3 veces con amortiguador de unión. Al final, se resuspendieron en 15  $\mu\text{L}$  de PBS y 4  $\mu\text{L}$  de mezcla lítica 4X. Las muestras se hirvieron por 5 minutos, se sometieron a SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. La detección de proteínas biotiladas se realizó bloqueando la membrana con PBS más 2 % de Tween por 30 minutos. Posteriormente, la membrana se lavó con tPBS y se incubó con estreptavidina acoplada a peroxidasa por una hora a temperatura ambiente, al

final se lavó el exceso de estreptavidina con tPBS y se reveló empleando el kit de quimioluminiscencia SuperSignal West Pico de Pierce.

### **Competencia homóloga y heteróloga de unión**

En el caso de las competencias, se incubaron 10 µg de BBMV's con 5 nM de toxina Cry1Ab biotinilada en presencia o ausencia de un exceso de 50, 100, 250, 500 y 1000 veces más de toxina fría (toxina no marcada, Cry1Ab para competencias homólogas y Cry2Ab en el caso de competencias heterólogas) en amortiguador de unión durante 1 hora a temperatura ambiente. Las uniones se lavaron 3 veces con amortiguador de unión y al final se resuspendieron en 15 µL de PBS y 4 µL de mezcla lítica 4X. Se analizaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. La detección se realizó igual que con las uniones.

### **Inducción de proteínas recombinantes**

La cepa hospedera *E. coli* BL21 ( $\lambda$ DE3) transformada con los plásmidos CR7-12 y ALP en pET22b se creció durante la noche en medio LB adicionado con ampicilina (100 µg/mL), y a partir de este cultivo se inoculó otro de mayor volumen (30 mL de medio LB con antibióticos) y se creció a 30 °C en agitación constante (250 rpm). Al alcanzar una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.6 a 0.8 se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y se dejó crecer por otras 4 horas; al final se centrifugó el cultivo para recuperar la biomasa.

### **Purificación de proteínas recombinantes**

Las proteínas recombinantes CR7-12-his y ALP-his se purificaron mediante cromatografía de afinidad por níquel. La pastilla celular se resuspendió en urea pH 8 (Urea 8M, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM y NaCl 500 mM) y se sonicó a máxima potencia, dando 5 pulsos de 45 segundos, con un minuto entre cada pulso. El lisado celular se centrifugó a 25 432 x g por 30 minutos y se recuperó el sobrenadante.



Para purificar las proteínas se empacó una columna con 1 mL de resina de agarosa acoplada a níquel (Ni-NTA de Qiagen), se equilibró con Tris 20 mM, NaCl 500 mM (amortiguador TN) e imidazol 20 mM. Se pasó el sobrenadante por la columna dejando eluir la fracción no unida. Las proteínas recombinantes tienen una etiqueta de histidinas y se inmovilizan en la columna, ya que se forman interacciones iónicas entre los anillos de imidazol de las histidinas y el níquel. Para eliminar las proteínas que se pegan de manera inespecífica a la resina, se lavó con amortiguador TN adicionado con 30 mM y 40 mM de imidazol. Las proteínas recombinantes se eluyeron de la resina con amortiguador TN más 1 M de imidazol.

### ***Ligand blot***

#### ALP, APN y CR7-12

Se corrieron 5 µg de receptores purificados (ALP-his y CR7-12-his) y 6 µL de lisado celular de APN en SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon con tPBS más 2 % de BSA por 2 horas a temperatura ambiente. Se enjuagaron con agua y se lavaron con tPBS por 15 y 5 minutos (2 veces). Se incubaron con toxina marcada con biotina en tPBS más 0.1 % de BSA por 2 horas. Una vez transcurrido el tiempo, las membranas se enjuagaron con tPBS y se lavaron como se mencionó anteriormente. Finalmente las membranas se incubaron con estreptavidina acoplada a peroxidasa por una hora a temperatura ambiente, se lavó el exceso de estreptavidina con tPBS y se revelaron mediante quimioluminiscencia.

#### BBMVs

Para el caso de los *ligand blots* con BBMVs de *M. sexta* se corrieron 10 µg de proteínas en SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. El tratamiento de las membranas fue el mismo que para los *ligand blots* con receptores purificados, sólo que en este caso el amortiguador en el que se incubó la toxina tenía 1 % de BSA.

## Electroforesis de dos dimensiones

Las muestras (100 µg de BBMV) se limpiaron con el kit 2-D Clean Up de GE Healthcare siguiendo las instrucciones del proveedor. Al final, las muestras se resuspendieron en 125 µL de DeStreak rehydratation solution (DeStreak reagent, Urea, Thiourea y CHAPS). Las muestras se cuantificaron empleando el 2-D Quant Kit de Healthcare y se tomó la cantidad necesaria para obtener 70 y 80 µg de proteína. Se llevó a un volumen final de 125 µL y se agregaron los anfolitos (0.6 µL de IPG buffer pH 3-10). Las Immobiline DryStrips (GE Healthcare pH 3-10 y pH 4-7 de 7 cm) se rehidrataron con 125 µL de la muestra toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente fueron sometidas a isoelectroenfoque (IEF) usando el siguiente equipo: Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing System de GE Healthcare. La duración del IEF fue de 5 000 Vh para las tiras de pH 3-10 y de 7 000 Vh para las de pH 4-7. Las tiras se equilibraron en amortiguador con 6 M de Urea, 75 mM de Tris-HCl pH 8.8, 29.3 % de glicerol, 2 % de SDS y 0.002 % de azul de bromofenol, se dejaron agitando 15 minutos en el amortiguador antes mencionado adicionado con 100 mg/mL de DTT y posteriormente se incubaron otros 15 minutos con el mismo amortiguador pero adicionado con Iodoacetamida (250 mg/mL). Inmediatamente se corrió la segunda dimensión en SDS-PAGE al 12 %. Los geles se tiñeron con plata (Pierce silver stain kit) o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para proseguir con el *ligand blot*.

Una vez identificadas las proteínas de unión a Cry2Ab, se repitió la electroforesis de dos dimensiones y el gel se tiño con Coomassie Brilliant Blue G-250: EZBlue Gel Staining Reagent de Sigma. Los puntos se cortaron y se enviaron para secuenciación por espectrometría de masas (LC/MS/MS) a la unidad de proteómica del Instituto de Investigaciones Clínicas de Montreal.

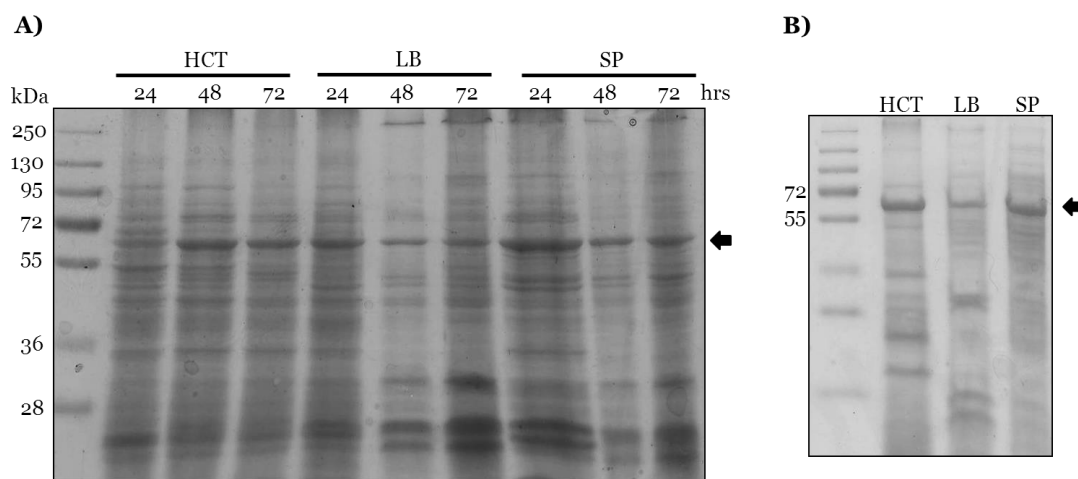
En los apéndices I y II se detalla la preparación de las soluciones y geles empleados.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Purificación de la toxina Cry2Ab

La toxina Cry2Ab se purificó a partir de la cepa Bt2Ab crecida en tres medios diferentes: HCT, LB y SP. Durante 72 horas se monitoreó la esporulación de los diferentes cultivos. Se observó que el cultivo esporulaba completamente a las 48 horas en medio SP, mientras que en HCT y LB esporuló hasta las 72 horas.

Se analizó el perfil de producción de proteínas de esta cepa en las condiciones mencionadas mediante SDS-PAGE (figura 11) y en todas las preparaciones de espora/cristal se observó que se enriquecía una banda de 65 kDa. La masa molecular predicha para Cry2Ab por el programa ProtParam es de 70.7 kDa, sin embargo, en todos los trabajos descritos hasta la fecha, la protoxina Cry2Ab migra alrededor de los 65 kDa [18, 142-150]. Al solubilizar la preparación de espora cristal con NaOH se mantuvo la banda de 65 kDa (figura 11B).



**Figura 11.** SDS-PAGE del perfil de producción de proteínas en la cepa Bt2Ab en distintos medios: HCT, LB y SP a las 24, 48 y 72 horas (A) y de las protoxinas solubilizadas con NaOH a partir de la preparación de espora cristal en HCT y LB a las 72 horas de crecimiento y SP a las 48 horas (B).

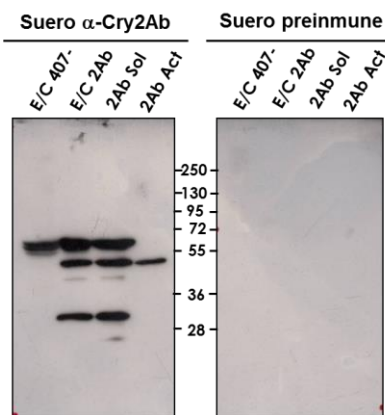
Debido a que en medio SP la cepa esporuló a las 48 horas se decidió seguir trabajando con ese medio de cultivo.

## **Generación de anticuerpos policlonales contra Cry2Ab**

Se evaluó la reactividad y especificidad de los anticuerpos policlonales obtenidos del suero de un conejo inmunizado con protoxina Cry2Ab. Los anticuerpos fueron muy inespecíficos ya que reconocían varias bandas incluso en la muestra de la cepa acristalífera (Bt 407-). La inespecificidad se debió al método empleado para aislar la proteína con la que se inmunizó, ya que se cortó la banda de SDS-PAGE correspondiente a Cry2Ab. Como se puede observar en la figura 11B, a pesar de que la banda de 65 kDa es la mayoritaria existen otras proteínas con una masa molecular similar que migran muy cerca de Cry2Ab, por lo que la preparación inoculada contenía proteínas contaminantes.

Para eliminar anticuerpos inespecíficos, el suero se inmunoadsorbió en una membrana de PVDF con preparación de espora cristal de la cepa Bt 407-. De esta manera, los anticuerpos que reaccionan con cualquier otra proteína distinta a Cry2Ab se quedan adheridos a la membrana. El suero inmunoadsorbido se probó contra distintas muestras (figura 12): reconoció a Cry2Ab en la preparación de espora cristal, a la protoxina soluble así como a la toxina activada, sin embargo, sigue reconociendo una banda de ~ 65 kDa en la preparación de Bt 407-. Como control, se evaluó el suero preinmune, éste no reconoció ninguna proteína (figura 12).

En las preparaciones de espora cristal y protoxina soluble, además de la banda de 65 kDa correspondiente a la protoxina Cry2Ab se reconocen otras dos de 50 y 30 kDa (figura 12), las cuales posiblemente sean productos de degradación de la protoxina, ya que si las preparaciones de espora/cristal no se lavan bien, pueden contener proteasas de Bt que la degraden. Sin embargo, al activar la toxina con tripsina (2Ab Act, figura 12), estos péptidos se eliminan por acción de esta proteasa.



**Figura 12.** Western blot de diferentes muestras de Cry2Ab empleando los anticuerpos policlonales anti-Cry2Ab generados en este estudio. Espora cristal de la cepa 407 – (E/C 407-), espora cristal de la cepa que expresa Cry2Ab (E/C 2Ab), la protoxina Cry2Ab soluble (2Ab sol) y la toxina activada (2Ab Act). Los sueros  $\alpha$ -Cry2Ab y preimmune se emplearon a una dilución 1:10 000.

## Bioensayo

Para determinar la dosis letal media ( $LC_{50}$ ) de la protoxina Cry2Ab se realizó un bioensayo con larvas neonatas de *M. sexta*, empleando las siguientes dosis de protoxina soluble: 10, 20, 30, 35, 45, 50, 60, 70, 80, 100, 150 y 200 ng/cm<sup>2</sup>. Como la protoxina se solubiliza con hidróxido de sodio, el control negativo (agua) se adicionó con el mismo volumen de NaOH empleado en la dosis más alta (200 ng/cm<sup>2</sup>).

El bioensayo se realizó por triplicado, al promedio de los tres experimentos se le realizó un análisis PROBIT utilizando el programa POLO-PC:

**Tabla 6. Dosis letal media de Cry2Ab contra larvas neonatas de *M. sexta*.**

Toxina	Muestra	$LC_{50}$
Cry2Ab	Protoxina soluble	43.6 ng/cm <sup>2</sup> (40.0 - 46.9)

Entre paréntesis se indican los límites de confianza (95 %).

La dosis letal media es de 43.6 ng/cm<sup>2</sup>. Al compararla con la  $LC_{50}$  reportada por Widner y Whiteley en 1989: 250 ng/cm<sup>2</sup>, y la obtenida por García Gómez B., datos no publicados: 200 ng/cm<sup>2</sup> observamos que la  $LC_{50}$  obtenida en este

trabajo es aproximadamente 5 veces mayor a la reportada previamente (ya que se requiere menos toxina para causar una mortalidad del 50 %). La diferencia entre estos tres estudios probablemente se deba al uso de diferentes muestras para el bioensayo: protoxina Cry2Ab soluble de Bt, protoxina sobreexpresada en *E. coli* y espora/cristal de Bt respectivamente.

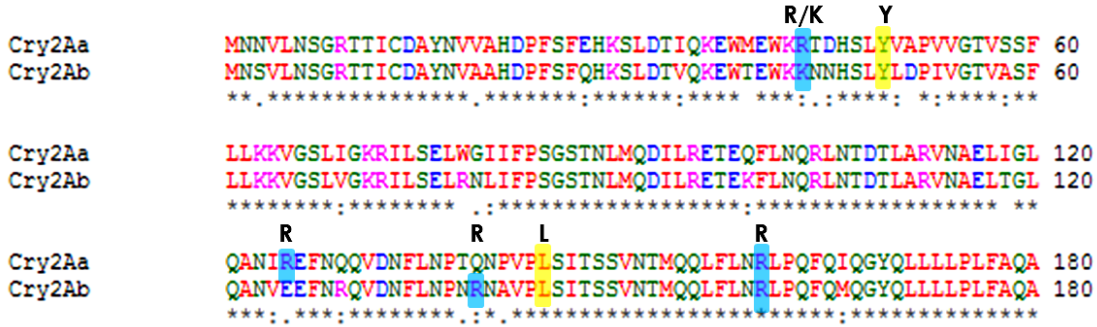
A pesar de obtener una  $LC_{50}$  mayor a la reportada previamente, observamos que Cry2Ab es menos tóxica que Cry1Ab contra *M. sexta*, cuya  $LC_{50}$  es de 1.3 ng/cm<sup>2</sup> (0.9-1.7) [7].

### **Activación de la protoxina**

Como se mencionó previamente, las toxinas Cry son producidas como protoxinas, y para liberar el fragmento activo son procesadas por proteasas del hospedero.

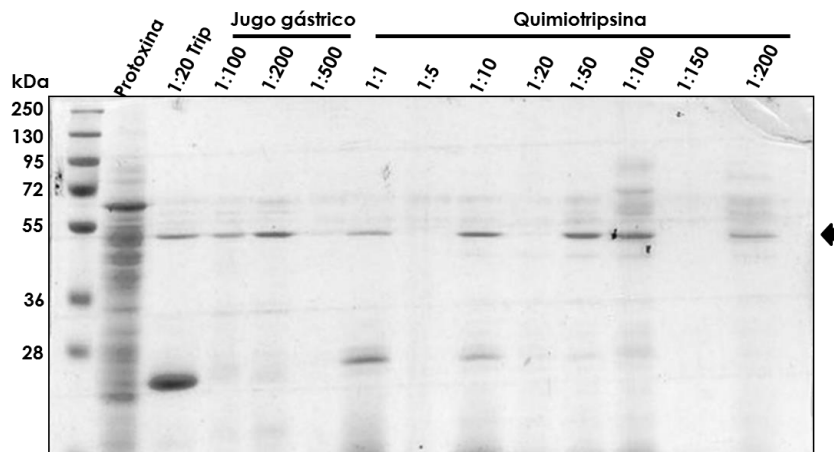
En dos reportes previos se observó que al incubar a la protoxina Cry2Aa con jugo gástrico de *L. dispar* ésta se procesa en los aminoácidos Y49 y L144, generando dos fragmentos de 58 y 50 kDa [146, 151]. El procesamiento en estos aminoácidos corresponde al sitio de corte de quimiotripsina; sin embargo, en la mayoría de los reportes la protoxina Cry2Ab se activa *in vitro* con tripsina [115-118, 152]. Estas proteasas tienen diferente especificidad: la tripsina hidroliza enlaces peptídicos en el extremo C-terminal de la lisina y arginina, excepto cuando el siguiente aminoácido es una prolina; mientras que la quimiotripsina corta las cadenas peptídicas en el extremo C-terminal de la tirosina, fenilalanina, triptófano y leucina. Realizamos un alineamiento del extremo N-terminal de Cry2Aa y Cry2Ab y observamos que la Y49 y la L144 están conservadas en ambas protoxinas (figura 13, resaltadas en amarillo), por lo que la diferencia en los protocolos de activación reportados para Cry2Aa y Cry2Ab no se debe a diferencias en el sitio de corte de quimiotripsina.

Analizamos el procesamiento *in silico* de Cry2Aa y Cry2Ab con tripsina (figura 13, sitios de corte resaltados en azul) y determinamos que la mayor diferencia entre procesar Cry2Ab con tripsina o quimiotripsina es de 6 aminoácidos.



**Figura 13.** Alineamiento del extremo N-terminal (primeros 180 aa) de Cry2Aa y Cry2Ab. En amarillo se resaltan los sitios de corte de quimiotripsina y en azul, los sitios de corte de tripsina más cercanos a Y49 y L144.

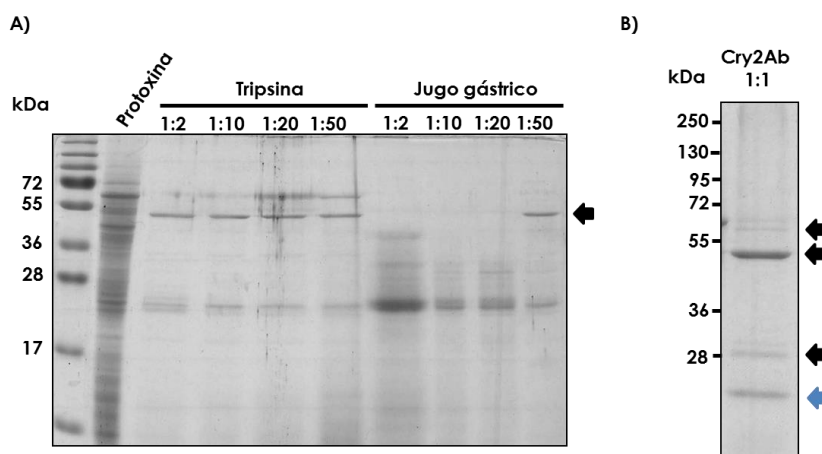
Se realizaron pruebas de activación de la protoxina Cry2Ab con jugo gástrico de *M. sexta*, tripsina y quimiotripsina (figura 14). Las tres activaciones generan un fragmento de ~50 kDa. Los cortes realizados por quimiotripsina (amarillo, figura 13) y tripsina (azul, figura 13) difieren en sólo 6 aminoácidos, estas pequeñas diferencias no se pueden apreciar en SDS-PAGE y parecen no tener un efecto en el modo de acción de la toxina Cry2Ab (ver más adelante).



**Figura 14.** SDS-PAGE de la protoxina Cry2Ab activada con tripsina, jugo gástrico de *M. sexta* y quimiotripsina a diferentes relaciones proteasa:protoxina. La flecha señala el fragmento que corresponde a la toxina activada.

Debido a que en los trabajos en los que se describen las competencias entre toxinas Cry1A y Cry2A se emplea toxina activada con tripsina, se decidió seguir trabajando con esta proteasa.

Se realizó la activación de Cry2Ab con distintas relaciones de tripsina (figura 15). Como se puede observar en la figura 15A, la proteólisis no es totalmente efectiva, ya que aún a relaciones 1:2 se alcanza a ver protoxina no procesada. Al analizar con detalle el procesamiento de Cry2Ab con tripsina (figura 15B), se puede observar que se generan 3 fragmentos: una banda mayoritaria de 50 kDa y otras dos de 58 y 30 kDa aproximadamente. De acuerdo a los reportes previos, el fragmento de 58 kDa tiene el dominio I completo (las 7  $\alpha$ -hélices), mientras que el fragmento de 50 kDa carece de las tres primeras hélices, incluyendo la  $\alpha$ -hélice 3. Esta  $\alpha$ -hélice es importante para la oligomerización de la toxina y en consecuencia para su actividad insecticida, ya que mutantes en la  $\alpha$ -hélice 3 que evitan la oligomerización no son tóxicos contra *M. sexta* [9]. No existen reportes donde se describa la presencia y/o funcionalidad del fragmento de 30 kDa; podría tratarse solamente de un fragmento de degradación de la toxina. Sin embargo, dado que observamos que la toxina procesada es activa contra *M. sexta* (ver más adelante) a pesar de que la proteína mayoritaria es el fragmento de 50 kDa, que en teoría no tiene la  $\alpha$ -hélice 3, suponemos que el fragmento de 30 kDa corresponde a la región eliminada de la proteína de 50 kDa.



**Figura 15.** SDS-PAGE de la activación de Cry2Ab. A) Activación de la protoxina Cry2Ab con tripsina y jugo gástrico de *M. sexta* a diferentes relaciones proteasa:protoxina. B) Activación de Cry2Ab con



tripsina 1:1. Las flechas negras señalan los fragmentos generados al procesar con tripsina, y la flecha azul señala a la tripsina (23.3 kDa).

Para determinar si los fragmentos generados mediante proteólisis de la protoxina Cry2Ab son activos, se evaluó la toxicidad de la toxina Cry2Ab activada con tripsina contra larvas neonatas de *M. sexta* (tabla 7). Como control negativo se empleó agua con tripsina y PMSF, en las mismas relaciones que la dosis más alta.

**Tabla 7. Bioensayo de toxina Cry2Ab activada con tripsina.**

Dosis	Individuos	Insectos muertos	Porcentaje de mortalidad
0 ng/cm <sup>2</sup>	24	6	25 %
50 ng/cm <sup>2</sup>	24	24	100 %
100 ng/cm <sup>2</sup>	24	24	100 %

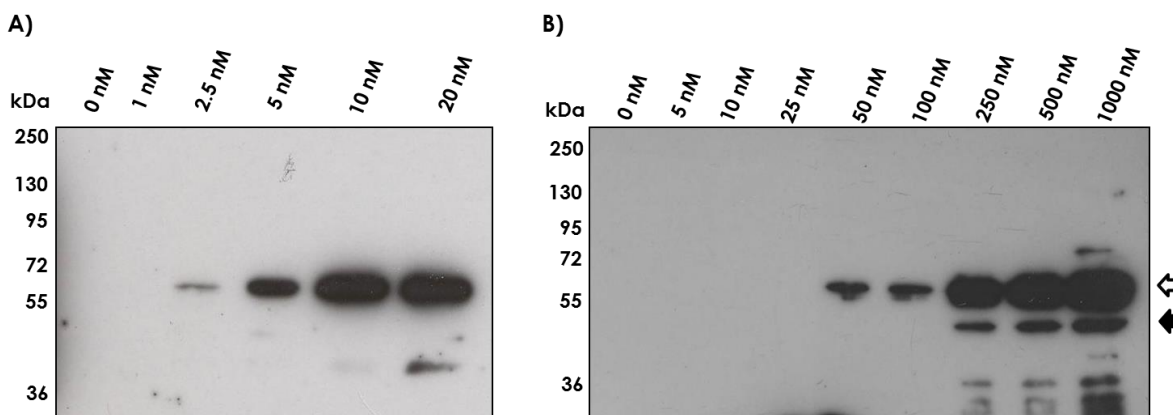
No se pudo realizar el análisis PROBIT debido a que sólo se emplearon dos dosis, sin embargo, de los datos obtenidos es evidente que a pesar del efecto tóxico de la tripsina y el PMSF, los fragmentos de Cry2Ab generados mediante proteólisis con tripsina son activos contra *M. sexta*.

### **Marcaje de Cry1Ab y Cry2Ab con biotina**

Después del procesamiento con tripsina, las toxinas Cry1Ab y Cry2Ab activadas se marcaron con un éster de biotina que se une a lisinas:

- ✓ Cry1Ab: la forma activada de Cry1Ab tiene una masa molecular de 65 kDa. En la figura 16A se puede observar la banda correspondiente a la toxina Cry1Ab activada desde una concentración de 2.5 nM.
- ✓ Cry2Ab: como se mencionó previamente el procesamiento de esta toxina con tripsina no es completamente efectivo, en la figura 16B se pueden observar ambas formas de Cry2Ab (protoxina: flecha blanca y toxina activada: flecha negra). La protoxina (65 kDa) se detecta desde los 50 nM,

en cambio, la proteína activada (50 kDa) se detecta hasta una concentración de 250 nM. Este resultado probablemente se deba a que el contenido de lisinas de la protoxina es mayor (13 Lys) que el de la toxina activada (5 Lys).



**Figura 16.** Western blot de las toxinas Cry1Ab (A) y Cry2Ab (B) marcadas con biotina. Se cargaron 10  $\mu$ L de amortiguador de fosfatos con toxina Cry1Ab o Cry2Ab a la concentración indicada. La detección se realizó con estreptavidina acoplada a peroxidasa, empleada a una dilución 1:10 000. Las flechas señalan a la toxina activada (negra) y a la protoxina (blanca).

### Preparación de BBMVs

Se prepararon BBMVs de intestinos aislados de larvas de tercer instar de *M. sexta* y se evaluó la actividad específica de ALP y APN.

En las preparaciones de BBMVs no sólo se aíslan las microvellosidades de las células columnares del intestino, sino también pequeñas cantidades de material contaminante que proviene de mitocondrias, microsomas, membranas basolaterales así como elementos del citoesqueleto [153].

Por lo general, si una toxina (Cry1Ab) es tóxica contra cierto insecto (*M. sexta*), ésta se une de manera saturable y específica a las BBMVs. Este tipo de unión indica que las toxinas se unen a un número limitado de sitios definidos en las BBMVs, y siendo que la ALP y APN se han reportado como receptores de Cry1Ab

su enriquecimiento en la preparación de BBMVes es un indicativo de la calidad de la muestra para la realización de ensayos de unión.

En la tabla 8 se observa el enriquecimiento de ALP y APN en las BBMVes de *M. sexta* con respecto al homogenizado total.

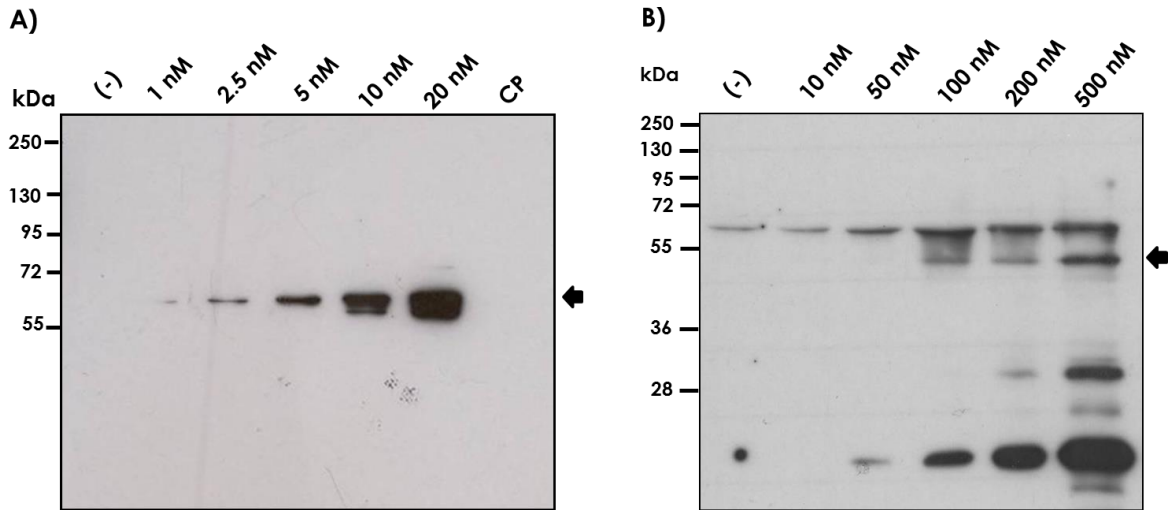
**Tabla 8. Actividad de ALP y APN en el homogenizado y BBMVes de *M. sexta*.**

	<b>Actividad en homogenizado</b>	<b>Actividad en BBMVes</b>	<b>Relación BBMVes/Homogenizado</b>
<b>ALP</b>	143.3 U	322.1 U	2.2
<b>APN</b>	186.4 U	621.14 U	3.3

Las unidades de ALP están dadas en nmol/mg\*min y de APN como nmol/μg\*min.

### **Unión de Cry1Ab y Cry2Ab a BBMVes de *M. sexta***

Se evaluó la unión de distintas concentraciones de Cry1Ab y Cry2Ab marcadas con biotina a BBMVes de *M. sexta* (figura 17). Se puede observar que tanto Cry1Ab como Cry2Ab se unen a las BBMVes de *M. sexta*, sin embargo, Cry1Ab se une desde 2.5 nM mientras que la unión de Cry2Ab se detecta hasta los 100 nM. Los ensayos de unión en solución se realizan en un volumen de 100 μL, diez veces más de lo que se empleó para verificar la marca de la toxina (figura 16), es por ello que a pesar de que la concentración mínima a la que se detecta Cry2Ab es de 250 nM, en este experimento pudimos observar unión de Cry2Ab desde los 100 nM.



**Figura 17.** Western blot de la unión de Cry1Ab (A) y Cry2Ab (B) a BBMVs de *M. sexta*. Se incubaron concentraciones crecientes de Cry1Ab y Cry2Ab activadas y marcadas con estreptavidina a 10  $\mu$ g de BBMVs de *M. sexta*. Como control negativo (-) se cargaron 10  $\mu$ g de BBMVs. Como control de precipitación (CP) las toxinas se incubaron en ausencia de BBMVs. La detección de las toxinas marcadas con biotina se realizó con estreptavidina acoplada a peroxidasa. Las flechas señalan a la toxina marcada.

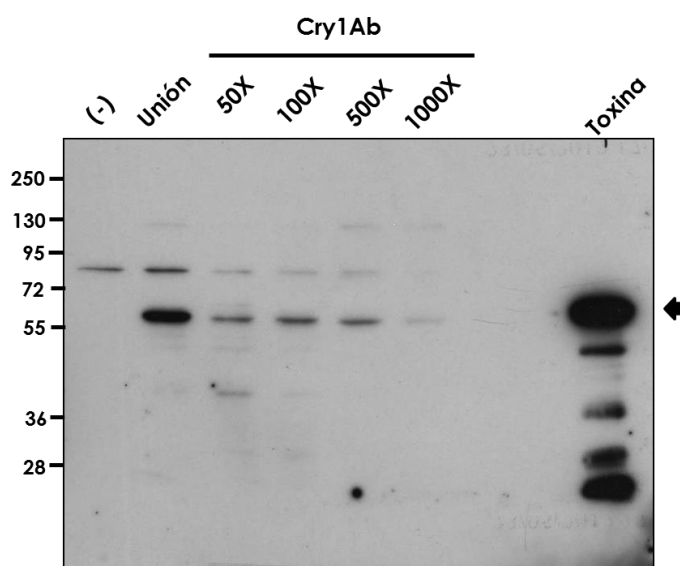
Como se mencionó previamente, existe una correlación directa entre la unión de la toxina a las BBMVs y su toxicidad. En reportes previos se demostró que Cry1Ac es 35 veces más afín por las BBMVs de *H. armigera* y *H. zea* que Cry2Ab [117], lo cual concuerda con el hecho de que Cry2Ab es menos tóxica que Cry1Ac contra estos dos insectos. Algo similar podría ocurrir en *M. sexta*, ya que se demostró que Cry2Ab es menos tóxica que Cry1Ab y, esto también se ve reflejado en las diferencias de unión de estas dos toxinas a las BBMVs de *M. sexta*. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que Cry2Ab no se marca bien, lo cual disminuye la sensibilidad de este método para detectar unión de esta toxina. Por lo anterior se requeriría calcular las constantes de disociación de Cry1Ab y Cry2Ab para obtener datos cuantitativos acerca de su afinidad por las BBMVs.

### Competencias de unión

En estos ensayos se evalúa la unión de la toxina marcada a BBMVs en presencia de un competidor (toxina no marcada o fría). Si las toxinas empleadas

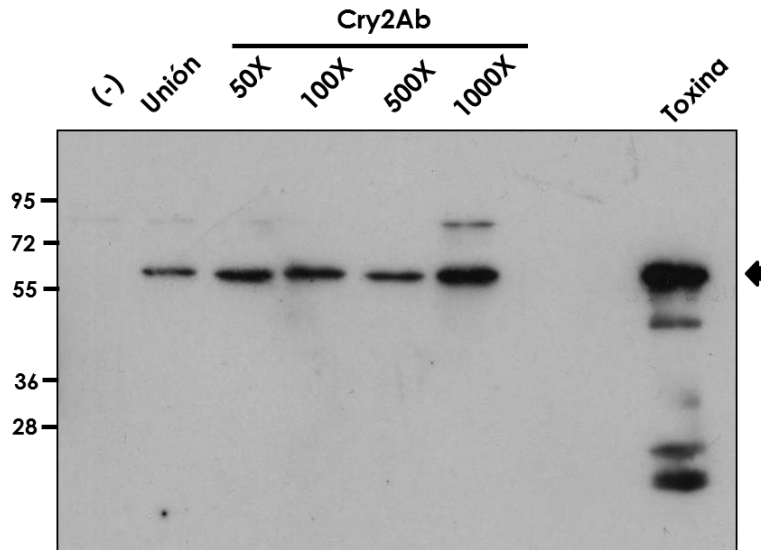
se unen a los mismos sitios, el exceso de toxina fría compite la unión de la toxina marcada.

**Competencia homóloga** (con toxina activada con tripsina, figura 18): en este caso se empleó una concentración de 5 nM de Cry1Ab marcada y se compitió hasta con 1000 veces más toxina fría (Cry1Ab no marcada). Como se trata de la misma toxina, los sitios de unión se comparten, por lo que el exceso de toxina fría disminuye la unión de la toxina marcada a las BBMV. Este resultado sugiere que la unión de Cry1Ab a las BBMV de *M. sexta* es específica y saturable.



**Figura 18.** Western blot de la competencia homóloga de unión de Cry1Ab. La unión de 5 nM de Cry1Ab marcada a las BBMV de *M. sexta* se compitió con un exceso de 50, 100, 500 y 1000 veces más toxina fría. La flecha indica la banda correspondiente a Cry1Ab (65 kDa). Como control negativo (-) se corrieron las BBMV sin toxina y como positivo la toxina Cry1Ab marcada.

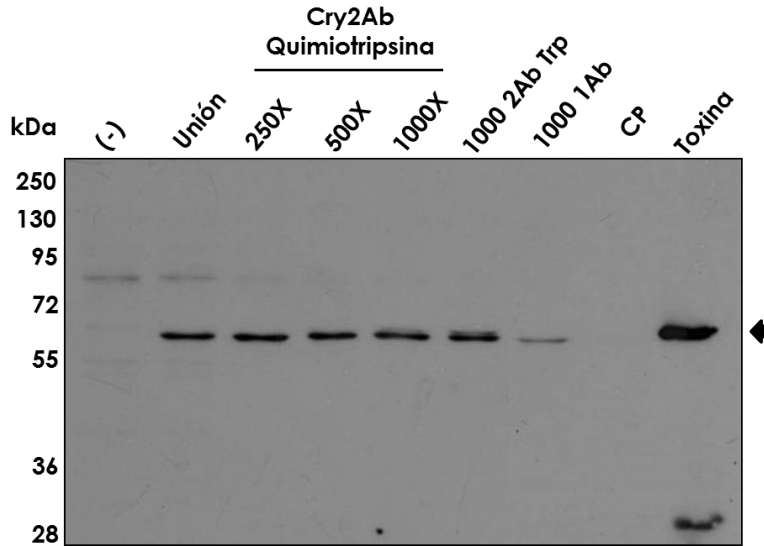
**Competencia heteróloga** (con toxina activada con tripsina, figura 19): La unión de la toxina Cry1Ab (5 nM) marcada a BBMV de *M. sexta* se compitió con un exceso de 50, 100, 500 y 1000 veces más de Cry2Ab fría activada con tripsina. Se observó que aún en presencia de 5 000 nM (1000 X) de toxina Cry2Ab, la unión de Cry1Ab a las BBMV no se afecta. El resultado anterior indica que Cry2Ab no compite con Cry1Ab por la unión a las vesículas.



**Figura 19.** Western blot de la competencia heteróloga de unión entre Cry1Ab y Cry2Ab. La unión de 5 nM de Cry1Ab marcada a las BBMV de *M. sexta* se compitió con un exceso de 50, 100, 500 y 1000 veces más de toxina Cry2Ab fría. La flecha indica la banda correspondiente a Cry1Ab (65 kDa). Como control negativo (-) se corrieron las BBMV sin toxina y como positivo la toxina Cry1Ab marcada.

**Competencia heteróloga** (con toxina activada con quimiotripsina, figura 20): como un control adicional se realizó la competencia de unión de Cry1Ab con Cry2Ab activada con quimiotripsina. Como se observa en la figura 20, Cry2Ab no compite la unión de Cry1Ab a BBMV de *M. sexta*. Esto demuestra que los seis aminoácidos adicionales que se eliminan al procesar a la toxina con quimiotripsina, en lugar de tripsina, no afectan su capacidad de competir a la toxina Cry1Ab.

El hecho de que Cry2Ab no compita con la unión de Cry1Ab a BBMV de *M. sexta* sugiere que estas toxinas se unen a diferentes receptores. Lo anterior concuerda con el hecho de que la generación de resistencia cruzada entre toxinas Cry1A y Cry2A es poca o nula (Tabla 5).

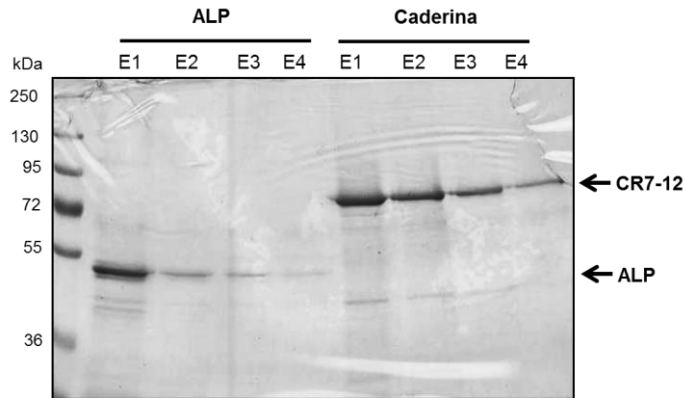


**Figura 20.** Western blot de la competencia heteróloga de unión entre Cry1Ab y Cry2Ab (activada con quimiotripsina). La unión de 5 nM de Cry1Ab marcada se compitió con un exceso de 250, 500 y 1000 veces más de toxina Cry2Ab fría. También se compitió con un exceso de 1000 X Cry2Ab activada con tripsina (1000 2Ab Trp) y Cry1Ab (1000 1Ab) como comparación. CP, control de precipitación. La flecha indica la banda correspondiente a Cry1Ab. Como control negativo (-) se corrieron las BBMV's sin toxina y como positivo la toxina Cry1Ab marcada.

Para corroborar la hipótesis de que Cry2Ab no comparte los mismos sitios de unión que Cry1Ab, se evaluó la unión de ambas toxinas a los receptores de Cry1Ab. Como se observa en la tabla 2, previamente se demostró que Cry1Ab se une a tres proteínas en *M. sexta*: ALP, APN1 y caderina. Sin embargo, en este trabajo sólo se evaluó la unión a ALP y los repetidos 7-12 del receptor de caderina, debido que no se ha podido lograr la expresión estable del receptor APN1.

### **Ligand blot de Cry1Ab y Cry2Ab a ALP y caderina (repetidos 7-12)**

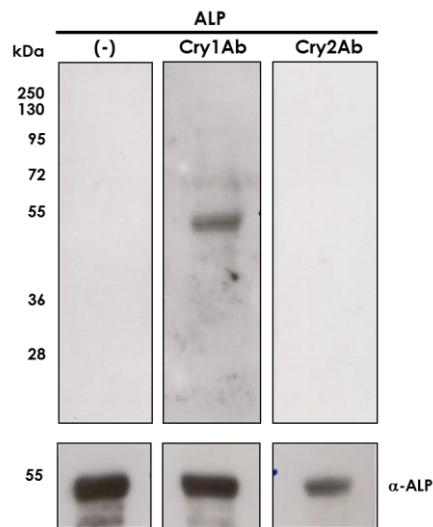
Para realizar los ensayos de unión de Cry1Ab y Cry2Ab a ALP y caderina, las proteínas recombinantes ALP-his y CR7-12-his se purificaron mediante cromatografía de afinidad por níquel (figura 21).



**Figura 21.** SDS-PAGE de la purificación de ALP y CR7-12. Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad por níquel. Las proteínas se eluyeron con 1 M de imidazol.

Una vez purificados los receptores, se realizó un *ligand blot* empleando la toxina Cry2Ab marcada con biotina.

**Unión a ALP** (figura 22): Previamente se reportó la unión de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac a una ALP de 65 kDa en *M. sexta* [36, 73]. En este estudio también se observó la interacción de Cry1Ab con la ALP de *M. sexta*. Sin embargo, en el caso de Cry2Ab no se detectó interacción con esta proteína,

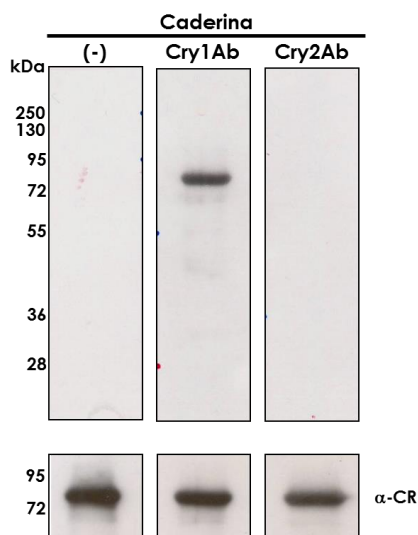


**Figura 22.** *Ligand blot* de Cry1Ab y Cry2Ab marcada con biotina a ALP. La membrana con 5 µg de ALP purificada se incubó con 10 nM de toxina marcada y se reveló con estreptavidina. Como control negativo (-) la membrana se incubó sólo con amortiguador. Se realizó la inmunodetección de ALP ( $\alpha$ -ALP) empleando anticuerpos policlonales.



Los reportes en cuanto a resistencia cruzada entre toxinas Cry1A y Cry2A debida a alteraciones en la ALP son contradictorios. Por un lado, la reducción del transcrito de mALP en *H. armigera* (BtR) no causa resistencia cruzada entre Cry1Ac y Cry2Ab, mientras que en *H. virescens* (YHD2), la disminución en la expresión de ALP sí correlaciona con la generación de resistencia cruzada entre Cry1Ac y Cry2A (tabla 5). Sin embargo, la cepa YHD2 también tiene alteraciones en el receptor de caderina, por lo que habría que evaluar la contribución de cada uno de estos receptores en la generación de resistencia cruzada.

**Unión a caderina** (figura 23): la caderina es una glicoproteína de 210 kDa. En este estudio se purificó una proteína recombinante que comprende los repetidos 7 al 12 de esta proteína. Se observó que Cry1Ab es capaz de unirse a CR7-12, esto concuerda con los trabajos en los que se describió que las toxinas Cry1A interactúan con los repetidos 7, 11 y 12 del receptor de caderina a través de las asas 2, 3 y  $\alpha 8$  del dominio II. En cambio, la toxina Cry2Ab no interactuó con CR7-12.



**Figura 23.** Ligand blot de Cry1Ab y Cry2Ab marcada con biotina a CR7-12. La membrana con 5  $\mu$ g de CR7-12 purificada se incubó con 10 nM de toxina marcada y se reveló con estreptavidina. Como control negativo (-) la membrana se incubó sólo con amortiguador. Se realizó la inmunodetección de caderina ( $\alpha$ -CR) empleando anticuerpos policlonales.

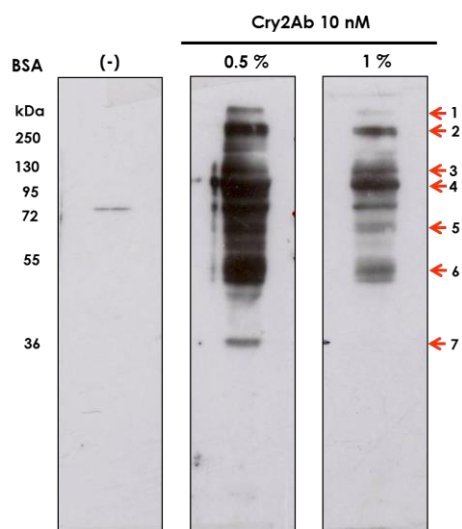
Mediante *ligand blots* demostramos que a diferencia de Cry1Ab, Cry2Ab no se une a la ALP ni a los repetidos 7-12 del receptor de caderina sobreexpresados en *E. coli*. Estos resultados pueden deberse a diversas razones:

- Probablemente la ALP y la caderina no sean receptores de Cry2Ab. Ya que Cry2Ab no se unió a la ALP ni a los repetidos 7-12 del receptor de caderina.
- El hecho de que no se haya observado unión entre Cry2Ab la ALP y los repetidos 7-12 del receptor de caderina podría deberse a que al ser producidos en *E. coli*, estos receptores no están glicosilados.
- Cómo sólo se expresaron los repetidos 7 al 12 del receptor de caderina, existe la posibilidad de que Cry2Ab se una a otros repetidos de la caderina.

Para determinar con que proteínas endógenas de *M. sexta* interacciona Cry2Ab se realizó un *ligand blot* empleando las BBMV de este lepidóptero.

### **Ligand blot de Cry2Ab a BBMVs de *M. sexta***

Mediante ensayos de unión tipo *ligand blot* de Cry2Ab marcada con biotina a BBMVs de *M. sexta* se identificaron 7 bandas que unen a la toxina (figura 24):



**Figura 24.** *Ligand blot* de Cry2Ab marcada con biotina a BBMVs de *M. sexta*. Las proteínas de las BBMVs se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. Las membranas se incubaron en PBS con BSA al 1% (-) o en PBS con BSA al 0.5 y al 1% en presencia de 10 nM de Cry2Ab activada marcada con biotina.

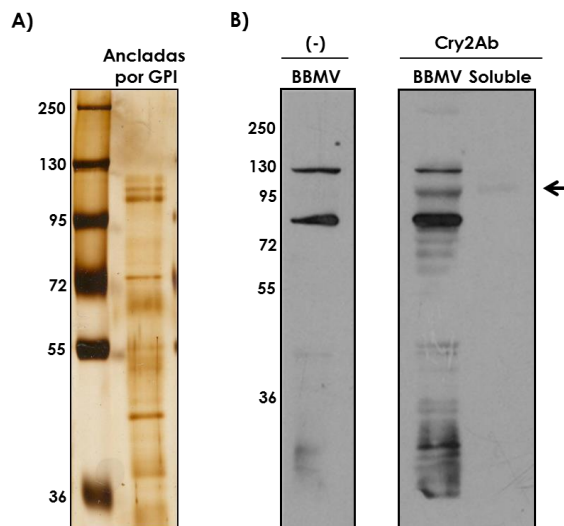
- 2 bandas de más de 250 kDa (figura 24, bandas 1 y 2): hasta la fecha sólo se han descrito 2 proteínas de alto peso molecular que unen a las toxinas Cry: la proteína BTR270 de *L. dispar* [38] y P252 de *B. mori* [80]. BTR270 une a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ba pero no une a Cry1Ca, Cry2Aa, Cry2Ba ni Cry3Aa, mientras que P252 une a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac.
- 2 bandas en el rango de 95-130 kDa (figura 24, bandas 3 y 4): En este rango de pesos moleculares se encuentran las APN's (90-170 kDa). En *M. sexta* se describió la unión de Cry1Ab a una APN de clase 1 [65] y otra de clase 2 (120 kDa) [44]. Adicionalmente, se describió otra APN de 106 kDa que une a las toxinas Cry1Ca y Cry1Aa [64].
- 1 banda de aproximadamente 70 kDa (figura 24, banda 5): La ALP previamente identificada en *M. sexta* como receptor de Cry1Ab tiene una masa molecular de 65 kDa [44]. En este trabajo no se observó la unión de Cry2Ab a una versión recombinante de ALP, sin embargo, debido a que la interacción de la toxina con su receptor podría depender de modificaciones post-traduccionales, no se descarta la posibilidad de que la ALP sea blanco de unión de Cry2Ab. Adicionalmente, en este rango de masas moleculares se describió una  $\alpha$ -amilasa (70 kDa) que une a las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa en el díptero *A. albimanus* [81].
- 1 banda de aproximadamente 50 kDa (figura 24, banda 6): La única proteína previamente reportada que une a toxinas Cry en este rango de peso molecular es la actina (42 kDa), la cual se identificó como blanco de unión de Cry1Ac mediante análisis proteómicos [71].
- 1 banda de 36 kDa, esta última sólo se observa cuando el amortiguador de incubación de la toxina se adiciona con 0.5 % de BSA (figura 24, banda 7), lo cual sugiere que la unión es débil y quizá no sea específica. La única proteína de bajo peso molecular reportada que une a toxinas Cry es la

ADAM 3 metaloproteasa (30 kDa) del coleóptero *L. decemlineata* [82]. Sin embargo, en lepidópteros no se ha descrito ninguna proteína de unión a toxinas Cry de menos de 50 kDa.

Adicionalmente, se observa una banda de ~85 kDa, sin embargo, la misma proteína se detecta en el carril incubado sin toxina (figura 24, control negativo [-]). Como parte de los controles de un experimento, Cheng Du observó dos proteínas de 120 y 85 kDa en las BBMV's preparadas de larvas de quinto instar de *M. sexta* que eran reconocidas por la estreptavidina. Aparentemente, se trata de dos proteínas biotiniladas de *M. sexta* [154]. Como se describe en la sección de materiales y métodos, en este estudio se empleó la toxina marcada con biotina y la detección de ésta se realiza con estreptavidina acoplada a peroxidasa. En diversos experimentos se pueden observar las proteínas de 85 y 120 kDa (figuras 18, 19, 20 y 24). Siempre se emplearon los controles adecuados para distinguir estas dos proteínas endógenas de la toxina (figuras 18, 19 y 20) o las proteínas de unión a Cry2Ab (figura 24).

### **Ligand blot de Cry2Ab a proteínas ancladas por GPI a BBMV's de *M. sexta***

En el caso de Cry1Ab se demostró que la toxina se une a proteínas ancladas a la membrana mediante glicosilfosfatidilinositol, entre estas proteínas se encuentran la APN y ALP. En este trabajo se evaluó si alguna de las 7 proteínas de unión a Cry2Ab, identificadas mediante *ligand blot* a las BBMV's de *M. sexta* se ancla a la membrana mediante GPI. Para esto, las BBMV's se trataron con PI-PLC (fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol), esta enzima liberó las proteínas ancladas por GPI, las cuales se separaron mediante SDS-PAGE (figura 25A). Finalmente, se analizó la unión de Cry2Ab a estas proteínas mediante *ligand blot* (figura 25B).



**Figura 25.** SDS-PAGE de las proteínas ancladas por GPI a las BBMV de *M. sexta* teñido con plata (A) y *Ligand blot* de Cry2Ab activada marcada con biotina a BBMV y proteínas ancladas por GPI (B). El control negativo (-) se incubó sólo con PBS.

Cry2Ab se une a una sola proteína anclada por GPI con masa molecular entre 95 y 130 kDa (figura 25B). Mediante espectrometría de masas se identificó a esta proteína como APN. Los resultados obtenidos muestran que 38 péptidos generados a partir de la banda correspondiente a APN alinean con APN2 y 38 péptidos con APN3 de *M. sexta* (Tabla 9).

**Tabla 9. Identificación por espectrometría de masa de la proteína de unión a Cry2Ab anclada por GPI en *M. sexta*.**

Probabilidad	Más del 95 %	80 % al 94 %	50 % al 79 %	20 % al 49 %	0 % al 19 %
--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	-------------

Proteínas identificadas	Número de acceso	Masa molecular	Blanco antes de la muestra	Muestra: Banda de 95-130 kDa
Aminopeptidasa 3 [ <i>Manduca sexta</i> ]	20279109	108 kDa		38
Aminopeptidasa N [ <i>Manduca sexta</i> ]	4582686 (+1)	107 kDa		38
RecName: Full = Membrane alanyl...	2499901 (+1)	111 kDa		29
Aminopeptidasa N [ <i>Manduca sexta</i> ]	37780226	90 kDa		16

Laccase 1 [ <i>Manduca sexta</i> ]	26190489	91 kDa		3
------------------------------------	----------	--------	--	---

El código de colores mostrado en la parte superior indica la probabilidad de que la proteína identificada sea la correcta. Los números en la tabla representan el número de secuencias de aminoácidos diferentes que se asocian sólo con la proteína indicada.

Previamente se reportó que Cry1Ab se une a APN1 de *M. sexta* [155]. En este trabajo identificamos a la APN2 y APN3 como posibles blancos de unión de Cry2Ab. Estos resultados apoyan los experimentos en los que se demuestra que Cry2Ab no compite por los mismos sitios de unión con Cry1Ab. Adicionalmente, también se reportó que no se desarrolla resistencia cruzada a Cry2Ab en tres líneas de insectos resistentes a Cry1Ac, en las que la resistencia está asociada a defectos en la APN1 [103, 105, 107]. Estos datos sugieren que la APN1 no es blanco de unión de Cry2Ab. Sin embargo, aún se debe determinar si Cry2Ab se une a APN2 y/o a APN3, ya que estos dos receptores tienen una masa molecular de 107 y 108 kDa, respectivamente, y es difícil separarlos mediante SDS-PAGE. Lo anterior se puede lograr mediante geles de dos dimensiones ya que los puntos isoeléctricos de las APNs son distintos (APN2: 5.6 y APN3: 6.3).

En el ligand blot de Cry2Ab a las BBMV de *M. sexta* (figura 24) se identificó una proteína que une a Cry2Ab (banda 5), cuyo peso molecular concuerda con el reportado para las ALPs (~70 kDa). Sin embargo, en el *ligand blot* de Cry2Ab a proteínas ancladas por GPI (figura 25B), no se detectó ninguna proteína con peso molecular de 70 kDa. Este resultado sugiere que la proteína de 70 kDa que une a Cry2Ab no es ALP, ya que estas proteínas se anclan a la membrana a través de GPI.

### **Identificación de proteínas de unión a Cry2Ab mediante enfoques proteómicos**

Las BBMV tienen una composición diversa de proteínas, entre éstas podemos encontrar algunas con masas moleculares similares que no se pueden distinguir mediante geles de una dimensión. La electroforesis de dos dimensiones es una

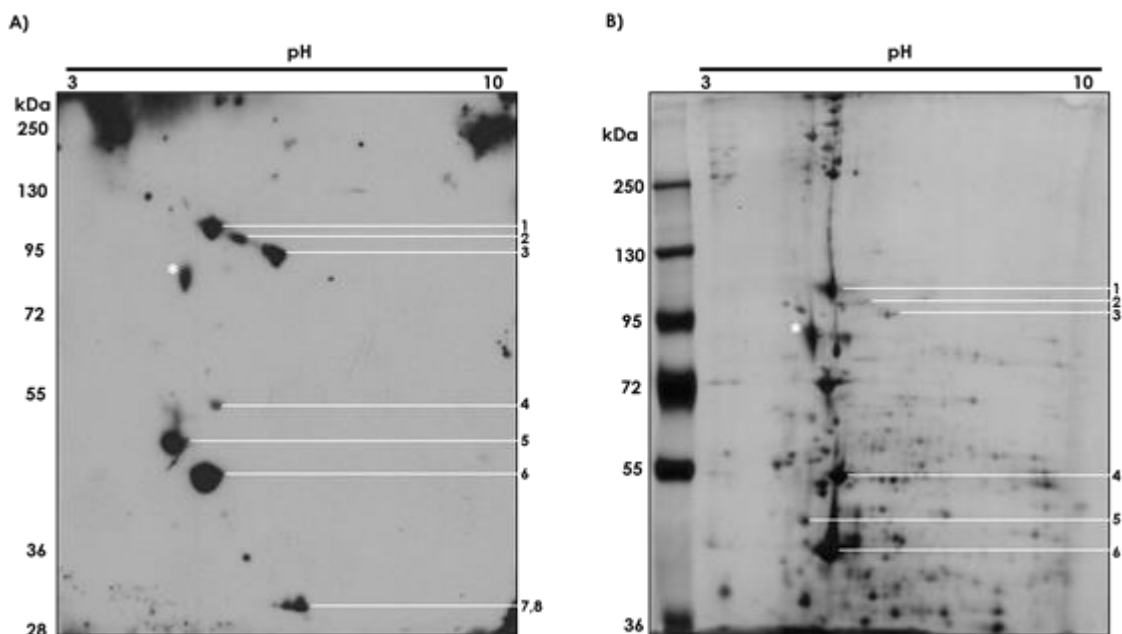
técnica ampliamente usada para el análisis de mezclas complejas de proteínas. Este método separa a las proteínas de acuerdo a dos propiedades independientes: en la primera dimensión, isoelectroenfoque (IEF), las proteínas se separan de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI), mientras que en la segunda dimensión, son separadas por su masa molecular mediante SDS-PAGE.

En 2003 McNail y colaboradores realizaron un análisis proteómico de las BBMV de larvas de quinto instar de *M. sexta*. En este estudio identificaron alrededor de 450 proteínas individuales mediante geles de 2D [71]. Adicionalmente, esta tecnología se ha empleado para realizar estudios comparativos entre cepas resistentes y sensibles a toxinas Cry, de hecho, en 2003 Jurat-Fuentes observó que en una cepa de *H. virescens* resistente a Cry1Ac se abate la expresión de ALP, lo anterior permitió demostrar que la ALP tiene un papel importante en el mecanismo de acción de Cry1Ac [37].

En este trabajo se emplearon geles de dos dimensiones (2D) en combinación con experimentos de *ligand blot* para identificar los blancos de unión de Cry2Ab en las BBMV de *M. sexta*.

Se identificaron ocho proteínas a las que se une la toxina Cry2Ab (figura 26A).

En el rango de 95 a 130 kDa se observan 3 proteínas (figura 26A, puntos 1, 2 y 3) con un punto isoeléctrico entre de 5 y 7, sin embargo, al comparar el *Western blot* con el gel teñido con plata (figura 26B) se puede observar que en realidad, la toxina Cry2Ab se une a 7 puntos, pero debido a que se encuentran muy cercanos uno del otro, en el *Western blot* se detectan como uno solo.



**Figura 26.** Ligand blot de Cry2Ab activada marcada con biotina a BBMV de *M. sexta* separadas mediante geles de 2D empleando tiras de pH de 3 a 10 (A). Gel 2D de BBMV de *M. sexta* teñido con plata (B). Los números a la derecha de cada figura indican las proteínas de unión a Cry2Ab. En la figura izquierda (A) la segunda dimensión se separó en SDS-PAGE al 12 % mientras que en la figura de la derecha (B) se empleó un gel al 10 %.

En el genoma de *M. sexta* están anotadas 4 APNs (Tabla 10). Las proteínas 1,2 y 3, figura 26A, identificadas como blancos de unión de Cry2Ab se encuentran en el rango de peso molecular y punto isoeléctrico predicho para las APNs (Tabla 10). Sin embargo anteriormente se demostró que Cry2Ab sólo se une a la APN2 y APN3 (Tabla 9).

**Tabla 10. APNs anotadas en el genoma de *M. sexta*.**

Clase de APN	Número de acceso	Masa molecular predicho (kDa)	Punto isoeléctrico teórico
APN1	AAF07223.1	112	5.8
APN2	CAA66466.2	107	5.6
APN3	AAM18718.1	108	6.3
APN4	AAM13691	114	5.9

La masa molecular y punto isoeléctrico se determinaron con el programa ProtParam.



Por debajo de los 95 kDa se detectó una proteína (figura 26 y 27A, marcada con un \*) que aparentemente une a Cry2Ab, sin embargo, previamente se demostró que se trata de una proteína endógena de *M. sexta* que reacciona con la estreptavidina (figura 24).

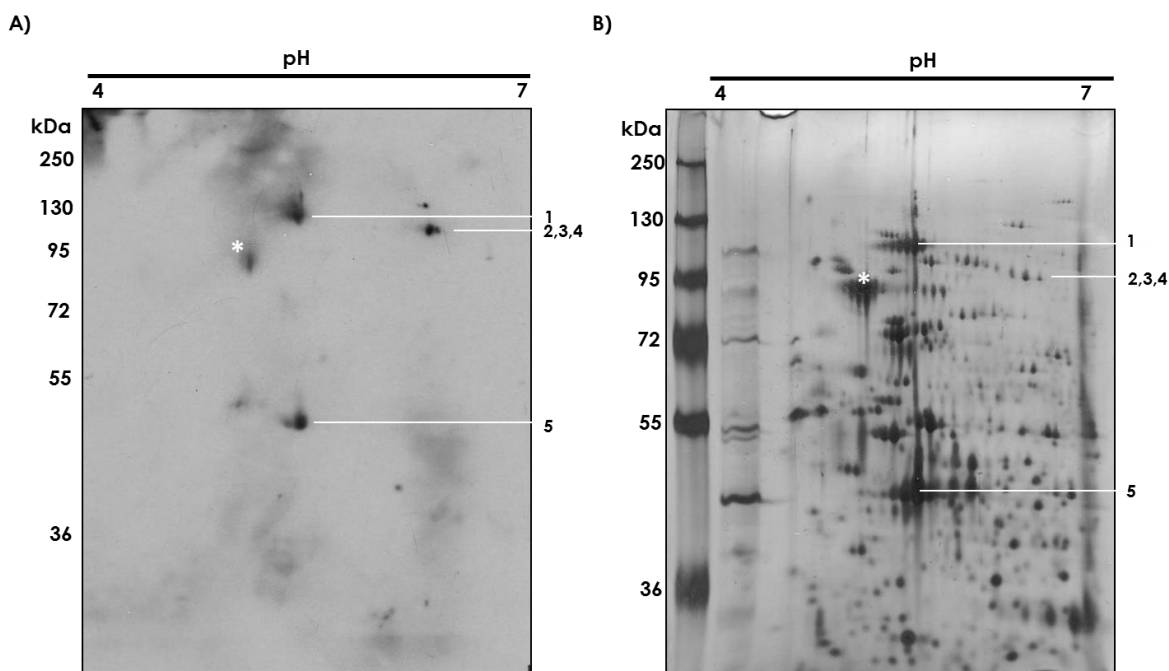
Alrededor de los 50 kDa se detectaron 3 puntos. El punto 6 coincide con la masa molecular y el pI de la actina. En un trabajo previo se observó que en BBMV de quinto instar de *M. sexta* separadas mediante 2D, la toxina Cry1Ac se une a un punto idéntico (en peso molecular y pI) al punto 6 observado en este estudio, mediante espectrometría de masas se demostró que se trataba de actina [71]. Los puntos 4 y 5 parecen ser reconocidos de manera inespecífica ya que desaparecen al lavar la membrana por más tiempo.

Los puntos 7 y 8 tienen una masa molecular de aproximadamente 30 kDa, la cual es similar a la de la banda 7 que une a Cry2Ab en ensayos de *ligand blot* con BBMV (figura 24). Probablemente se trate de diversas isoformas de una misma proteína.

Previamente se identificaron dos proteínas de más de 250 kDa que se unen a la toxina Cry2Ab (figura 24 y datos no mostrados), pero no se pudieron observar nuevamente (figura 26A), probablemente por la concentración del gel empleado (12 %). Sin embargo, mediante espectrometría de masas se determinó la identidad de estas proteínas (ver más adelante).

Debido a que todas las proteínas identificadas como blanco de unión de Cry2Ab están en un mismo rango de pH (4-7), se emplearon tiras de gradiente lineal de pH de 4 a 7 para resolver las proteínas de las BBMV de *M. sexta* mediante IEF. Lo anterior con el fin de mejorar la resolución de las proteínas en este rango y disminuir el riesgo de contaminación con otras proteínas al secuenciar por espectrometría de masas.

El *ligand blot* con Cry2Ab se volvió a realizar, pero ahora con las muestras separadas mediante tiras de pH 4-7. Se identificaron cinco proteínas (figura 27A) que corresponden a los puntos 1, 3 y 6 de las previamente identificadas (figura 26). Estas proteínas se secuenciaron por espectrometría de masas para conocer su identidad.



**Figura 27.** *Ligand blot* de Cry2Ab activada marcada con biotina a BBMV de *M. sexta* separadas mediante geles de 2D empleando tiras de pH de 4 a 7 (A). Gel 2D de BBMV de *M. sexta* teñido con plata (B). Los números a la derecha de cada figura indican las proteínas de unión a Cry2Ab.

### **Proteínas de unión a Cry2Ab en *M. sexta*.**

Se secuenciaron por espectrometría de masas los puntos correspondientes a las proteínas de unión a Cry2Ab identificadas mediante *ligand blot* de la toxina a las BBMV de *M. sexta* separadas mediante geles de dos dimensiones (Tabla 11):

**Tabla 11. Identificación por espectrometría de masa de las proteínas de unión a Cry2Ab en *M. sexta*.**

Probabilidad Más del 95 % 80 % al 94 % 50 % al 79 % 20 % al 49 % 0 % al 19 %

Proteínas identificadas	Número de acceso	MW (kDa)	B L K	Muestra: > 250 kDa 1	Muestra: >250 kDa 2	B L K	Muestra: 120 kDa	B L K	Muestra: 45 kDa	B L K	Muestra: 36 kDa 1	B L K	Muestra: 36 kDa 2	B L K	Muestra: 36 kDa 3
RecName: Full = Membrane alanyl...	gi   2499901 (+1)	111								2	1				
Aminopeptidase 3 [ <i>Manduca sexta</i> ]	gi   20279109	108								24	5	14	3	8	2
Aminopeptidase N [ <i>Manduca sexta</i> ]	gi   4582686 (+1)	107			1					9	3	2		1	1
Aminopeptidase N [ <i>Manduca sexta</i> ]	gi   37780226	90								1	1				
H (+)-transporting ATPase [ <i>Manduca sexta</i> ]	gi   11062 (+1)	68		54	39					35	14	24	6	17	4
Non-muscle actin [ <i>Manduca sexta</i> ]	gi   28070937	42	1	6	18		9		34	4	2				
RecName: Full = Actin, muscle; Flags: Precursor	gi   1703156...	42					1		3						
Ribosomal protein P0 [ <i>Manduca sexta</i> ]	gi   268306372	34									22	1	23	3	14

El código de colores mostrado en la parte superior indica la probabilidad de que la proteína identificada sea la correcta. Los números en la tabla representan el número de secuencias de aminoácidos diferentes que se asocian sólo con la proteína indicada.

- ✧ Dos proteínas de más de 250 kDa (figura 24 y datos no mostrados): los resultados obtenidos muestran que se trata de una ATPasa transportadora de protones ( $H^+$  transporting ATPase). El peso molecular estimado de dicha proteína es de 68.1 kDa mientras que su pI es de 5.1. Sin embargo, la proteína que se analizó mediante espectrometría de masas migra arriba de los 250 kDa.

Al realizar un BLAST, se encontró que el fragmento con el cual alinean los péptidos corresponde a la subunidad A de la V-ATPasa de *M. sexta*. Una posibilidad es que el complejo proteico de la V-ATPasa no se disocie totalmente y por ello se observe una migración anómala de esta proteína.

- ✧ Una proteína de 120 kDa (figura 27, punto 1): se identificó como actina. Sin embargo, a pesar de que la probabilidad de que la proteína identificada sea la correcta (mayor al 95 %), sólo 9 péptidos alinean con la secuencia de actina. El peso molecular aparente de la proteína 1 es de aproximadamente 120 kDa (figura 27), mientras que el de la actina es de 42 kDa. Podría tratarse de un dímero de actina; sin embargo, en la figura 27B se puede observar una estría que conecta los puntos 1 y 5, por lo que también existe la posibilidad de que se trate de contaminación ya que el punto 5 también se identificó como actina (ver más adelante).

- ✧ Proteína de 45 kDa (figura 27, punto 5): de acuerdo a los resultados de la espectrometría de masas, 34 péptidos de la proteína 5 alinean con la actina. La proteína 5 tiene una masa molecular aparente de aproximadamente 45 kDa, y un pI alrededor de 5. Ambos datos concuerdan con la masa molecular y el punto isoeléctrico de la actina: 41.8 kDa y pI 5.3.

- ✧ Tres proteínas con masa molecular aparente de 30 kDa (figura 26A). Las tres proteínas, se identificaron como la proteína ribosomal P0 de *M. sexta*, cuya masa molecular es de 34 kDa y tiene un pI de 6.3.

Los puntos 2, 3 y 4 (figura 27) también se secuenciaron mediante espectrometría de masas. Sin embargo, el análisis de las secuencias de péptidos contra el genoma de *M. sexta* no arrojó ningún resultado. Este análisis se repitió contra las bases de datos de *B. mori* y *D. melanogaster*, tomando en cuenta que están mejor anotadas que la de *M. sexta*; sin embargo, esta búsqueda tampoco arrojó resultados significativos. Por el contrario, al comparar con el genoma de humano se identificó contaminación por queratina.

Las tablas de los resultados de la secuenciación por espectrometría de masas generadas por el programa Scaffold Viewer se anexan en el apéndice 3.

Mediante espectrometría de masas se determinó la identidad de cinco proteínas de *M. sexta* que unen a Cry2Ab en los ensayos de *ligand blot* (tabla 12):

**Tabla 12. Proteínas de unión a Cry2Ab**

<b>Proteína:</b>	<b>Número de acceso</b>	<b>MW</b>	<b>pI</b>
<b>Actina</b>	CAD58315.1	42 kDa	5.3
<b>Subunidad A de la ATPasa transportadora de H<sup>+</sup></b>	CAA45537.1	68 kDa	5.1
<b>APN2</b>	CAA66466.2	107 kDa	5.6
<b>APN3</b>	AAM18718.1	108 kDa	6.3
<b>Proteína ribosomal P0</b>	ACY95307.1	34 kDa	6.3

### **Papel de la actina en el mecanismo de acción de las toxinas Cry.**

La actina es uno de los principales componentes del citoesqueleto; está involucrada en importantes procesos celulares como motilidad, división, transporte de vesículas, así como diferenciación y proliferación celular.

En este trabajo se identificó a la actina como proteína de unión a Cry2Ab. En estudios previos también se observó interacción entre la toxina Cry1Ac y la actina en diferentes insectos lepidópteros como: *H. virescens* [84], *H. armigera* [86] y *M. sexta* [71] así como de Cry4Ba con la actina del díptero *A. aegypti* [87].

La actina forma filamentos que se organizan en una red proteica que sirve como soporte para la superficie apical de las microvellosidades intestinales [157]. Esta proteína está acoplada a la membrana a través de otras proteínas como la anquirina, por lo que es poco probable que la actina sirva como receptor de las toxinas Cry de Bt. Sin embargo, debido a su localización, el contacto entre esta proteína y la toxina podría darse después de que la toxina se inserta en la membrana, o una vez que la integridad de la membrana celular se pierde o debilita debido a los poros líficos.

Se ha propuesto que la actina está involucrada en la defensa del organismo a las toxinas Cry, ya que en diversos estudios se ha observado que la expresión de ésta se aumenta al intoxicar a los insectos con toxinas Cry [158].

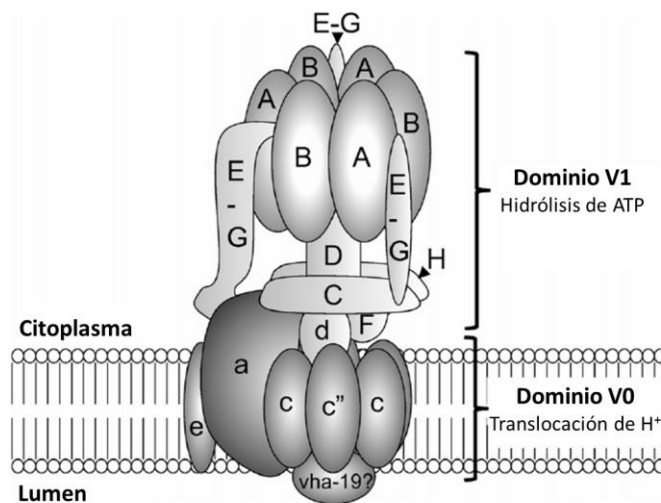
Recientemente se realizó un estudio en donde se observó que al silenciar el gen de actina en larvas de *A. aegypti* éstas se vuelven más sensibles a la toxina Cry11Aa [158], indicando que esta proteína podría ayudar a superar la intoxicación por toxina, probablemente promoviendo una respuesta celular contra las toxinas Cry que encienda un mecanismo de defensa.

### **Influencia de las V-ATPasas en la toxicidad de las toxinas Cry**

Las V-ATPasas son bombas de protones que acidifican algunos organelos como endosomas, lisosomas o vesículas secretorias. Sin embargo, también se encuentran en la membrana plasmática de muchas células animales donde están involucradas en la homeostasis del pH y/o en la energización de la membrana [159-161].

En el caso particular de *M. sexta* la V-ATPasa se localiza en la membrana apical de las células de globet, uno de los dos principales tipos celulares en este epitelio [161]. La V-ATPasa de *M. sexta* energiza todos los procesos de transporte transepitelial secundario en el intestino, incluyendo la absorción de aminoácidos y la regulación del pH luminal.

Las V-ATPasas son proteínas heteromultiméricas, consisten en dos dominios funcionales. Un dominio periférico catalítico, denominado V1 y el complejo membranaral V0 que conduce protones a través de la membrana (Figura 28). En *M. sexta*, el dominio V1 de la V-ATPasa de la membrana plasmática consiste de 8 subunidades (A-H), mientras que el dominio V0 consiste de 4 subunidades diferentes (a, c, d y e) [162].



**Figura 28.** Representación esquemática de la estructura de la V-ATPasa. Tomada de [163].

En reportes previos se demostró, empleando enfoques proteómicos, que algunas subunidades de la V-ATPasa son blanco de unión de toxinas Cry:

Cry1Ac une a la subunidad A de la V-ATPasa de *H. virescens* [84].

Cry1Ac une a la subunidad B de la V-ATPasa de *H. armigera* [86].

Cry4Ba une a las subunidades B y E de la V-ATPasa de *Ae. aegypti* [87].

En este estudio se demostró que la subunidad A de la V-ATPasa de *M. sexta* también es blanco de unión de la toxina Cry2Ab.

Es poco probable que las subunidades del complejo V1 de la V-ATPasa funcionen como receptores de las toxinas Cry, ya que se localizan en la parte citosólica del complejo proteico [162]. Sin embargo, la interacción entre la toxina y las subunidades periféricas de la V-ATPasa podría ocurrir de diversas formas. Una posibilidad es que al insertarse en la membrana, una parte de la toxina quede expuesta hacia la cara citosólica de la membrana y sea capaz de interactuar con proteínas cercanas, o bien, que como algunos autores han propuesto, la toxina sea internalizada y la interacción ocurra en vesículas endocíticas.

La V-ATPasa acopla la translocación de H<sup>+</sup> con la de K<sup>+</sup>, generando una diferencia de potencial que energiza los procesos de transporte a través de la membrana [164]. La interacción *in vivo* de las toxinas Cry con la V-ATPasa podría desestabilizar este proceso, alterando el balance del pH así como el transporte de iones y nutrientes. En estudios previos, empleando larvas susceptibles y resistentes de *P. interpunctella*, se demostró que en larvas resistentes se incrementan los niveles de V-ATPasa, por lo que se sugirió que este incremento podría resultar en un estado energético elevado que ayuda a los insectos a contender con la intoxicación por toxinas Cry [165].

### **APN2 y 3 como receptores de las toxinas Cry.**

En este estudio demostramos que Cry2Ab se une a las APN2 y/o APN3 de *M. sexta*.

De las 5 clases de APNs descritas, las de clase 2 comparten menos identidad de secuencia con otras clases de APNs [13]. De acuerdo a las predicciones bioinformáticas, las APNs de clase 2 se N-glicosilan.



Se ha reportado que las APN2 no unen a la toxina Cry1Ac [166]. En este trabajo observamos la posible unión de Cry2Ab a la APN2 de *M. sexta*. Estos resultados concuerdan con el hecho de que no se desarrolla resistencia cruzada entre Cry1Ac y Cry2Ab debido a que se unen a distintos receptores [78, 104, 118, 125-130, 137].

Sin embargo, se ha reportado que la APN2 se une a Cry1Aa y Cry1Ab bajo ciertas condiciones experimentales:

Cry1Aa: APN2 de *P. xylostella* y *B. mori* expresada en *E. coli* [62].

Cry1Ab: APN2 de *B. mori* expresada en *E. coli* [62].

Cry1Ab: APN2 de *M. sexta*, proteína endógena [57].

Como se observa, al igual que Cry2Ab, Cry1Ab también es capaz de unirse a la APN2 de *M. sexta*. En este estudio demostramos que Cry2Ab y Cry1Ab no compiten por la unión a las BBMV de *M. sexta*, lo cual sugería que no comparten los mismos sitios de unión en *M. sexta*. Sin embargo, también existe la posibilidad de que las toxinas Cry1Ab y Cry2Ab se unan a epítopes diferentes en una misma proteína, en este caso a la APN2. Otra posibilidad es que la identificación de la APN2 como blanco de unión de Cry2Ab sea un artefacto, ya que es difícil separar a la APN2 de la APN3 mediante SDS-PAGE debido a su masa molecular.

En este estudio también demostramos que Cry2Ab se une a la APN3 de *M. sexta*. Las APNs de clase 3 están altamente relacionadas con las de clase 1, al igual que éstas son proteínas O-glicosiladas. A pesar de ello, las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac sólo son capaces de unir a la APN1 de *M. sexta* [58, 155, 167] y APN2, en el caso de Cry1Ab [57]. Estos resultados apoyan la hipótesis de que Cry1Ab y Cry2Ab se unen a distintos receptores en las BBMV de *M. sexta*.

### **Proteínas ribosomales y su relación con la toxicidad de toxinas Cry.**

No existen reportes previos de interacción entre toxinas Cry y proteínas ribosomales, sin embargo, Contreras *et al.* observó que en el coleóptero *Tribolium*

*castaneum* los niveles de la proteína ribosomal L13a disminuyen en respuesta a la intoxicación con toxinas Cry3Ba y Cry23Aa/Cry37Aa. La proteína L13a forma parte de la subunidad 60S del ribosoma, y aunque su función en insectos se desconoce, los resultados sugieren que tiene un papel importante en la respuesta ante la intoxicación por Bt [168].

Además de las toxinas Cry, algunas cepas de Bt también producen toxinas Vip (Vegetative insecticidal proteins). Estas toxinas se secretan al medio durante la fase vegetativa de crecimiento y se ha propuesto que tienen un modo de acción distinto al de las toxinas Cry 3D [169]. En un trabajo previo se observó que la toxina Vip3A interactúa directamente con la proteína ribosomal S2. Mediante microscopia confocal se determinó que ambas proteínas colocalizan tanto en la superficie de células Sf21 como en el citoplasma, por lo que se propuso que la interacción inicial entre estas dos proteínas se da en la superficie de las células y posteriormente en el citoplasma de células que se comienzan a lisar. Adicionalmente, se demostró que esta interacción es importante para la toxicidad de Vip3A, ya que al silenciar la expresión de S2, se reduce la toxicidad de esta toxina [170].

En este trabajo se identificó la unión de Cry2Ab a la proteína ribosomal P0. Esta proteína pertenece a la familia L10 de proteínas ribosomales que forman parte de la subunidad 60S. A pesar de que existen un par de evidencias que sugieren que la unión de toxinas Cry y Vip a proteínas ribosomales es importante para la toxicidad, se debe demostrar la funcionalidad de esta interacción en el modo de acción de la toxina Cry2Ab.

# CONCLUSIONES

- La toxina Cry2Ab es activa contra *M. sexta*.
- Cry2Ab se une de forma específica a las BBMVs de *M. sexta* pero no es capaz de competir con la unión de Cry1Ab.
- Cry2Ab no se une a la ALP ni a los repetidos 7-12 del receptor de caderina de *M. sexta* sobreexpresados en *E. coli*.
- Cry2Ab se une a siete proteínas en las BBMVs de *M. sexta*, una de las cuales está anclada por GPI a las BBMVs.
- La actina, la subunidad A de la V-ATPasa, la proteína ribosomal P0 y las APN2 y/o 3 son blancos de unión de Cry2Ab en *M. sexta*.

# PERSPECTIVAS

- ✓ Determinar la secuencia completa de las proteínas identificadas como blancos de unión de Cry2Ab en *M. sexta*.
- ✓ Clonar los posibles receptores de Cry2Ab en *M. sexta* para medir la afinidad de la interacción toxina-receptor.
- ✓ Realizar bioensayos de Cry2Ab en presencia de sus posibles receptores para determinar si alguno de ellos sinergiza la toxicidad de Cry2Ab contra *M. sexta*.
- ✓ Demostrar la interacción *in vivo* de Cry2Ab con sus posibles receptores.
- ✓ Silenciar cada uno de los posibles receptores y medir la toxicidad de Cry2Ab contra las larvas silenciadas.

# APÉNDICE I

## Medios de cultivo, antibióticos y soluciones

### ➤ Medios de cultivo

#### ⊙ Medio HCT:

5 g de bacto triptona

1 g de casaminoácidos

Ajustar pH a 7.25 con hidróxido de potasio (KOH), llevar a 900 mL, si se hacen placas de agar agregar 15 g de bactoagar y esterilizar.

Posteriormente agregar:

50 mL de solución I: fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.5 M

1 mL de solución II: sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) 0.05 M sulfato de manganeso ( $\text{MnSO}_4$ ) 1 mM y sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ) 5 mM.

10 mL de solución III: sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) 150 mM y ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0.1 N

10 mL de solución IV: cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0.1 M

30 mL de glucosa al 10 %.

#### ⊙ Medio LB:

10 g de bacto triptona

5 g de extracto de levadura

10 g de cloruro de sodio (NaCl)

Llevar a 1 L, si se hacen placas de agar, agregar 15 g de bactoagar

#### ⊙ Medio SP:

8 g de caldo nutritivo

0.25 g de sulfato de magnesio  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1 g de cloruro de potasio (KCl)

1 mL de cloruro de manganeso ( $\text{MnCl}_2$ ) 10 mM

Ajustar pH a 7 con hidróxido de potasio (KOH), llevar a 1 L, si se hacen placas de agar agregar 15 g de bactoagar y esterilizar.

Posteriormente agregar:

2 mL de stock 2: 1.83 g de sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 1.4 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 1N en 50 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ .

1 mL de stock 3: cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0.5 M

### ➤ **Antibióticos**

- ⊙ Ampicilina (100 mg/mL): Disolver en agua.
- ⊙ Cloranfenicol (25 mg/mL): Disolver en etanol.
- ⊙ Eritomicina (10 mg/mL): Disolver en etanol y agua 1:1.
- ⊙ Tetraciclina (5 mg/mL): Disolver en etanol.

### ➤ **Soluciones**

- ⊙ Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF):  
Para preparar una solución 100 mM:  
Disolver 1.74 g de PMSF en 100 mL de isopropanol.
- ⊙ Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG):  
Para una solución 100 mM:  
Disolver 476 mg de IPTG en 20 mL de agua desionizada y filtrar.
- ⊙ Mezcla lítica 4X:  
Para 10 mL:  
4 mL de glicerol  
5 mL Tris 0.5 M pH 6.8  
0.4 g de SDS  
1 mL  $\beta$ -mercaptoetanol  
Agregar un poco de azul de bromofenol.

⊙ PBS:

NaCl 145 mM

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.8 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.8 mM

Ajustar pH a 7.2

⊙ Tripsina

Disolver 1 mg/mL en ácidos clorhídrico (HCl) 1 mM pH 3, CaCl<sub>2</sub> 20 mM.

# APÉNDICE II

## Geles desnaturalizantes (SDS-PAGE)

### Soluciones:

Amortiguador inferior (100 mL):

18.15 g Tris

0.05 g de EDTA

Ajustar pH a 8.8 y filtrar

0.4 g de SDS

Amortiguador superior:

6.07 g Tris

0.05 g de EDTA

Ajustar pH a 6.8 y filtrar

0.4 g de SDS

Acrilamida 30 % (100mL):

29.2 g de acrilamida

0.8 g de bis-acrilamida

PSA 10%:

1 g de PSA en 10 mL de agua

Amortiguador de corrida (1L):

3.02 g de Tris

14.4 g de glicina

1 g de SDS

### Gel separador 12.5% (2)

<b>Agua</b>	3.9 mL
<b>Amortiguador Inferior</b>	3 mL
<b>Acrilamida 30%</b>	5 mL
<b>PSA 10%</b>	120 µL
<b>TEMED</b>	4.8 µL

### Gel concentrador 4 % (2)

<b>Agua</b>	4.7 mL
<b>Amortiguador Inferior</b>	2 mL
<b>Acrilamida 30%</b>	1.2 mL
<b>PSA 10%</b>	80 µL
<b>TEMED</b>	8 µL



# APÉNDICE III

- ✦ Tabla generada por el programa Scaffold Viewer de los resultados del análisis por espectrometría de masas de los puntos 1 al 5 de la figura 27A, que corresponden a las proteínas de unión de Cry2Ab en las BBMV de *M. sexta*.

#	Visible?	Starred?	Bio View: Identified Proteins (2) Including 0 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	01-B...	02-S...	03-B...	04-S...	05-B...	06-S...	07-B...	08-S...	09-B...	10-S...	
1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	non-muscle actin [ <i>Manduca sexta</i> ]	gi 28070937	42 kDa	★	01-BLK before Spot 4		02-Spot 4	03-BLK before Spot 3	04-Spot 3	05-BLK before Spot 2	06-Spot 2	07-BLK before Spot 1	08-Spot 1	09-BLK before Spot 5	10-Spot 5
2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	ReclName: Full=Actin, muscle; Flags: Precursor	gi 1703156...	42 kDa	★									9	34	3

- ✦ Tabla generada por el programa Scaffold Viewer de los resultados del análisis por espectrometría de masas de diversas proteínas de unión a Cry2Ab: dos proteínas de más de 250 kDa (figura 24), proteína de 95-130 kDa anclada por GPI (figura 25) y tres proteínas de menos de 36 kDa (figura 26).

#	Visible?	Starred?	Bio View: Identified Proteins (8) Including 0 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	01-B...	02-S...	03-S...	04-B...	05-B...	06-S...	07-B...	08-S...	09-B...	10-S...
1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	H(+)-transporting ATPase [Mand... gi 11062 (+1)	gi 11062 (+1)	68 kDa		01-BLK before Spot 1 > 250									
2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	aminopeptidase 3 [ <i>Manduca sexta</i> ]	gi 20279109	108 kDa			54	39	21	35	14	24	6	17	4
3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	ribosomal protein P0 [ <i>Manduca s...</i> gi 268306372	gi 268306372	34 kDa					38	24	5	14	3	8	2
4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	aminopeptidase N [ <i>Manduca sexta</i> ]	gi 4582686 (+1)	107 kDa				1	38	9	3	2	23	3	14
5	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	non-muscle actin [ <i>Manduca sexta</i> ]	gi 28070937	42 kDa	★	1	6	18	5	4	2				
6	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	ReclName: Full=Membrane alanyl ... gi 2499901 (+1)	gi 2499901 (+1)	111 kDa	★				29	2	1				
7	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	aminopeptidase N [ <i>Manduca sexta</i> ]	gi 37780226	90 kDa					16	1	1				
8	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	laccase 1 [ <i>Manduca sexta</i> ]	gi 26190489	91 kDa					3						

En ambas tablas, el código de colores mostrado en la esquina superior izquierda indica la probabilidad de que la proteína identificada sea la correcta. Los números en la tabla representan el número de secuencias de aminoácidos diferentes que se asocian sólo con la proteína indicada.

# REFERENCIAS

1. Kumar, S., A. Chandra, and K.C. Pandey, *Bacillus thuringiensis (Bt) transgenic crop: an environment friendly insect-pest management strategy*. J Environ Biol, 2008. **29**(5): p. 641-53.
2. Schnepf, E., et al., *Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(3): p. 775-806.
3. Bravo, A., S.S. Gill, and M. Soberon, *Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control*. Toxicon, 2007. **49**(4): p. 423-35.
4. Ibrahim, M.A., et al., *Bacillus thuringiensis: a genomics and proteomics perspective*. Bioeng Bugs, 2010. **1**(1): p. 31-50.
5. Bravo, A., et al., *Bacillus thuringiensis: A story of a successful bioinsecticide*. Insect Biochem Mol Biol, 2011. **41**(7): p. 423-31.
6. Crickmore, N., et al., *Revision of the nomenclature for the Bacillus thuringiensis pesticidal crystal proteins*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(3): p. 807-13.
7. Jimenez-Juarez, N., et al., *Bacillus thuringiensis Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to Manduca sexta larvae*. J Biol Chem, 2007. **282**(29): p. 21222-9.
8. Muñoz-Garay, C., et al., *Oligomerization of Cry11Aa from Bacillus thuringiensis has an important role in toxicity against Aedes aegypti*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(23): p. 7548-50.
9. Rodriguez-Almazan, C., et al., *Dominant negative mutants of Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin function as anti-toxins: demonstration of the role of oligomerization in toxicity*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5545.
10. Carmona, D., et al., *Dominant negative phenotype of Bacillus thuringiensis Cry1Ab, Cry11Aa and Cry4Ba mutants suggest hetero-oligomer formation among different Cry toxins*. PLoS One. **6**(5): p. e19952.
11. Vachon, V., et al., *Role of helix 3 in pore formation by the Bacillus thuringiensis insecticidal toxin Cry1Aa*. Biochemistry, 2002. **41**(19): p. 6178-84.
12. Carmona, D., et al., *Dominant negative phenotype of Bacillus thuringiensis Cry1Ab, Cry11Aa and Cry4Ba mutants suggest hetero-oligomer formation among different Cry toxins*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19952.
13. Pigott, C.R. and D.J. Ellar, *Role of receptors in Bacillus thuringiensis crystal toxin activity*. Microbiol Mol Biol Rev, 2007. **71**(2): p. 255-81.
14. Boonserm, P., et al., *Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications*. J Mol Biol, 2005. **348**(2): p. 363-82.
15. Li, J.D., J. Carroll, and D.J. Ellar, *Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from Bacillus thuringiensis at 2.5 Å resolution*. Nature, 1991. **353**(6347): p. 815-21.
16. Grochulski, P., et al., *Bacillus thuringiensis CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation*. J Mol Biol, 1995. **254**(3): p. 447-64.
17. Galitsky, N., et al., *Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of Bacillus thuringiensis*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2001. **57**(Pt 8): p. 1101-9.
18. Morse, R.J., T. Yamamoto, and R.M. Stroud, *Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope*. Structure, 2001. **9**(5): p. 409-17.
19. Boonserm, P., et al., *Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from Bacillus thuringiensis at a 2.8-angstrom resolution*. J Bacteriol, 2006. **188**(9): p. 3391-401.
20. Guo, S., et al., *Crystal structure of Bacillus thuringiensis Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of Holotrichia parallela*. J Struct Biol, 2009. **168**(2): p. 259-66.
21. Hui, F., et al., *Structure and glycolipid binding properties of the nematocidal protein Cry5B*. Biochemistry, 2012. **51**(49): p. 9911-21.
22. Pardo-Lopez, L., M. Soberon, and A. Bravo, *Bacillus thuringiensis insecticidal 3-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection*. FEMS Microbiol Rev, 2012.

23. Gomez, I., et al., *Specific epitopes of domains II and III of Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in Manduca sexta*. J Biol Chem, 2006. **281**(45): p. 34032-9.
24. Pacheco, S., et al., *Domain II loop 3 of Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin is involved in a "ping pong" binding mechanism with Manduca sexta aminopeptidase-N and cadherin receptors*. J Biol Chem, 2009. **284**(47): p. 32750-7.
25. Gomez, I., et al., *Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin*. FEBS Lett, 2002. **513**(2-3): p. 242-6.
26. Arenas, I., et al., *Role of alkaline phosphatase from Manduca sexta in the mechanism of action of Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin*. J Biol Chem, 2010. **285**(17): p. 12497-503.
27. Pardo-Lopez, L., et al., *Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from bacillus thuringiensis induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion*. Biochemistry, 2006. **45**(34): p. 10329-36.
28. Bravo, A., et al., *Oligomerization triggers binding of a Bacillus thuringiensis Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1667**(1): p. 38-46.
29. Zhuang, M., et al., *Heliothis virescens and Manduca sexta lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation*. J Biol Chem, 2002. **277**(16): p. 13863-72.
30. Muñoz-Garay, C., et al., *Permeability changes of Manduca sexta midgut brush border membranes induced by oligomeric structures of different cry toxins*. J Membr Biol, 2006. **212**(1): p. 61-8.
31. Peyronnet, O., et al., *Ion channels induced in planar lipid bilayers by the Bacillus thuringiensis toxin Cry1Aa in the presence of gypsy moth (Lymantria dispar) brush border membrane*. J Membr Biol, 2001. **184**(1): p. 45-54.
32. Schwartz, J.L., et al., *Ion channels formed in planar lipid bilayers by Bacillus thuringiensis toxins in the presence of Manduca sexta midgut receptors*. FEBS Lett, 1997. **412**(2): p. 270-6.
33. Zhang, X., et al., *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 U S A, 2006. **103**(26): p. 9897-902.
34. Zhang, X., et al., *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 Differ, 2005. **12**(11): p. 1407-16.
35. Vadlamudi, R.K., et al., *Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of Bacillus thuringiensis*. J Biol Chem, 1995. **270**(10): p. 5490-4.
36. Knight, P.J., N. Crickmore, and D.J. Ellar, *The receptor for Bacillus thuringiensis CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran Manduca sexta is aminopeptidase N*. Mol Microbiol, 1994. **11**(3): p. 429-36.
37. Jurat-Fuentes, J.L. and M.J. Adang, *Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant Heliothis virescens larvae*. Eur J Biochem, 2004. **271**(15): p. 3127-35.
38. Valaitis, A.P., et al., *Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds Bacillus thuringiensis Cry1A toxins with high affinity*. Arch Insect Biochem Physiol, 2001. **46**(4): p. 186-200.
39. Hossain, D.M., et al., *Characterization of a novel plasma membrane protein, expressed in the midgut epithelia of Bombyx mori, that binds to Cry1A toxins*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(8): p. 4604-12.
40. Griffiths, J.S., et al., *Glycolipids as receptors for Bacillus thuringiensis crystal toxin*. Science, 2005. **307**(5711): p. 922-5.
41. Angst, B.D., C. Marcozzi, and A.I. Magee, *The cadherin superfamily: diversity in form and function*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 4): p. 629-41.
42. Nollet, F., P. Kools, and F. van Roy, *Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members*. J Mol Biol, 2000. **299**(3): p. 551-72.

43. Usui, T., et al., *Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled*. Cell, 1999. **98**(5): p. 585-95.
44. Chen, J., et al., *Comparison of the localization of Bacillus thuringiensis Cry1A delta-endotoxins and their binding proteins in larval midgut of tobacco hornworm, Manduca sexta*. Cell Tissue Res, 2005. **321**(1): p. 123-9.
45. Hua, G., et al., *Anopheles gambiae cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of Bacillus thuringiensis israelensis and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity*. Biochemistry, 2008. **47**(18): p. 5101-10.
46. Chen, J., et al., *Aedes aegypti cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. Biochem J, 2009. **424**(2): p. 191-200.
47. Fabrick, J., et al., *A novel Tenebrio molitor cadherin is a functional receptor for Bacillus thuringiensis Cry3Aa toxin*. J Biol Chem, 2009. **284**(27): p. 18401-10.
48. Park, Y., et al., *Enhancement of Bacillus thuringiensis Cry3Aa and Cry3Bb toxicities to coleopteran larvae by a toxin-binding fragment of an insect cadherin*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(10): p. 3086-92.
49. Vadlamudi, R.K., T.H. Ji, and L.A. Bulla, Jr., *A specific binding protein from Manduca sexta for the insecticidal toxin of Bacillus thuringiensis subsp. berliner*. J Biol Chem, 1993. **268**(17): p. 12334-40.
50. Gomez, I., et al., *Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by Bacillus thuringiensis*. Peptides, 2007. **28**(1): p. 169-73.
51. Hua, G., J.L. Jurat-Fuentes, and M.J. Adang, *Fluorescent-based assays establish Manduca sexta Bt-R(1a) cadherin as a receptor for multiple Bacillus thuringiensis Cry1A toxins in Drosophila S2 cells*. Insect Biochem Mol Biol, 2004. **34**(3): p. 193-202.
52. Gahan, L.J., F. Gould, and D.G. Heckel, *Identification of a gene associated with Bt resistance in Heliothis virescens*. Science, 2001. **293**(5531): p. 857-60.
53. Morin, S., et al., *Three cadherin alleles associated with resistance to Bacillus thuringiensis in pink bollworm*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5004-9.
54. Tabashnik, B.E., et al., *Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(12): p. 1128-31.
55. Wang, P., X. Zhang, and J. Zhang, *Molecular characterization of four midgut aminopeptidase N isozymes from the cabbage looper, Trichoplusia ni*. Insect Biochem Mol Biol, 2005. **35**(6): p. 611-20.
56. Agrawal, N., P. Malhotra, and R.K. Bhatnagar, *Interaction of gene-cloned and insect cell-expressed aminopeptidase N of Spodoptera litura with insecticidal crystal protein Cry1C*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(9): p. 4583-92.
57. Denolf, P., et al., *Cloning and characterization of Manduca sexta and Plutella xylostella midgut aminopeptidase N enzymes related to Bacillus thuringiensis toxin-binding proteins*. Eur J Biochem, 1997. **248**(3): p. 748-61.
58. Knight, P.J., B.H. Knowles, and D.J. Ellar, *Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for Bacillus thuringiensis CryIA(c) toxin*. J Biol Chem, 1995. **270**(30): p. 17765-70.
59. Takesue, S., et al., *Partial release of aminopeptidase N from larval midgut cell membranes of the silkworm, Bombyx mori, by phosphatidylinositol-specific phospholipase C*. Comp Biochem Physiol B, 1992. **102**(1): p. 7-11.
60. Yaoi, K., et al., *Aminopeptidase N from Bombyx mori as a candidate for the receptor of Bacillus thuringiensis Cry1Aa toxin*. Eur J Biochem, 1997. **246**(3): p. 652-7.
61. Luo, K., et al., *The heliothis virescens 170 kDa aminopeptidase functions as "receptor A" by mediating specific Bacillus thuringiensis Cry1A delta-endotoxin binding and pore formation*. Insect Biochem Mol Biol, 1997. **27**(8-9): p. 735-43.
62. Nakanishi, K., et al., *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 Lett, 2002. **519**(1-3): p. 215-20.
63. Banks, D.J., et al., *Bacillus thuringiensis Cry1Ac and Cry1Fa delta-endotoxin binding to a novel 110 kDa aminopeptidase in Heliothis virescens is not N-acetylgalactosamine mediated*. Insect Biochem Mol Biol, 2001. **31**(9): p. 909-18.

64. Luo, K., Y. J. Lu, and M. J. Adang, *A 106 kDa form of aminopeptidase is a receptor for Bacillus thuringiensis Cry1C  $\delta$ -endotoxin in the brush border membrane of Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol*, 1996. **26**: p. 783-791.
65. Shitomi, Y., et al., *A novel 96-kDa aminopeptidase localized on epithelial cell membranes of Bombyx mori midgut, which binds to Cry1Ac toxin of Bacillus thuringiensis*. *J Biochem*, 2006. **139**(2): p. 223-33.
66. Abdullah, M.A., A.P. Valaitis, and D.H. Dean, *Identification of a Bacillus thuringiensis Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochem*, 2006. **7**: p. 16.
67. Lorence, A., A. Darszon, and A. Bravo, *Aminopeptidase dependent pore formation of Bacillus thuringiensis Cry1Ac toxin on Trichoplusia ni membranes*. *FEBS Lett*, 1997. **414**(2): p. 303-7.
68. Herrero, S., et al., *Bacillus thuringiensis Cry1Ca-resistant Spodoptera exigua lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes*. *BMC Genomics*, 2005. **6**: p. 96.
69. Eguchi, M., et al., *Genetically defined membrane-bound and soluble alkaline phosphatases of the silkworm: their discrete localization and properties*. *Prog Clin Biol Res*, 1990. **344**: p. 267-87.
70. Itoh, M., et al., *Cloning and sequence analysis of membrane-bound alkaline phosphatase cDNA of the silkworm, Bombyx mori*. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1129**(1): p. 135-8.
71. McNall, R.J. and M.J. Adang, *Identification of novel Bacillus thuringiensis Cry1Ac binding proteins in Manduca sexta midgut through proteomic analysis*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2003. **33**(10): p. 999-1010.
72. Zuniga-Navarrete, F., et al., *A Tenebrio molitor GPI-anchored alkaline phosphatase is involved in binding of Bacillus thuringiensis Cry3Aa to brush border membrane vesicles*. *Peptides*, 2013. **41**: p. 81-6.
73. Flores-Escobar, B., et al., *Differential Role of Manduca sexta Aminopeptidase-N and Alkaline Phosphatase in the Mode of Action of Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac Toxins from Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, 2013. **79**(15): p. 4543-50.
74. Fernandez, L.E., et al., *A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in Aedes aegypti larvae*. *Biochem J*, 2006. **394**(Pt 1): p. 77-84.
75. Baxter, S.W., et al., *Parallel evolution of Bacillus thuringiensis toxin resistance in lepidoptera*. *Genetics*, 2011. **189**(2): p. 675-9.
76. Gahan, L.J., et al., *An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to Bacillus thuringiensis Cry1Ac toxin*. *PLoS Genet*, 2010. **6**(12): p. e1001248.
77. Atsumi, S., et al., *Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(25): p. E1591-8.
78. Wang, P., et al., *Mechanism of resistance to Bacillus thuringiensis toxin Cry1Ac in a greenhouse population of the cabbage looper, Trichoplusia ni*. *Appl Environ Microbiol*, 2007. **73**(4): p. 1199-207.
79. Tanaka, S., et al., *The ATP-binding cassette transporter subfamily C member 2 in Bombyx mori larvae is a functional receptor for Cry toxins from Bacillus thuringiensis*. *FEBS J*, 2013. **280**(8): p. 1782-94.
80. Pandian, G.N., et al., *Bombyx mori midgut membrane protein P252, which binds to Bacillus thuringiensis Cry1A, is a chlorophyllide-binding protein, and the resulting complex has antimicrobial activity*. *Appl Environ Microbiol*, 2008. **74**(5): p. 1324-31.
81. Fernandez-Luna, M.T., et al., *An alpha-amylase is a novel receptor for Bacillus thuringiensis ssp. israelensis Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito Anopheles albimanus (Diptera: Culicidae)*. *Environ Microbiol*, 2010. **12**(3): p. 746-57.
82. Ochoa-Campuzano, C., et al., *An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa Bacillus thuringiensis toxin receptor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **362**(2): p. 437-42.
83. Marroquin, L.D., et al., *Bacillus thuringiensis (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2000. **155**(4): p. 1693-9.
84. Krishnamoorthy, M., et al., *Identification of novel Cry1Ac binding proteins in midgut membranes from Heliothis virescens using proteomic analyses*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2007. **37**(3): p. 189-201.

85. Nakasu, E.Y., et al., *Analysis of Cry8Ka5-binding proteins from Anthonomus grandis (Coleoptera: Curculionidae) midgut*. J Invertebr Pathol, 2010. **104**(3): p. 227-30.
86. Chen, L.Z., et al., *Proteomic analysis of novel Cry1Ac binding proteins in Helicoverpa armigera (Hubner)*. Arch Insect Biochem Physiol, 2010. **73**(2): p. 61-73.
87. Bayyareddy, K., et al., *Proteomic identification of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from Aedes (Stegomyia) aegypti Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae*. Insect Biochem Mol Biol, 2009. **39**(4): p. 279-86.
88. Tabashnik, B.E., et al., *Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field*. J Econ Entomol, 2003. **96**(4): p. 1031-8.
89. Zhang, H., et al., *Early warning of cotton bollworm resistance associated with intensive planting of Bt cotton in China*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e22874.
90. Bagla, P., *India. Hardy cotton-munching pests are latest blow to GM crops*. Science, 2010. **327**(5972): p. 1439.
91. Storer, N.P., et al., *Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico*. J Econ Entomol, 2010. **103**(4): p. 1031-8.
92. Rensburg, J.B.J.V., *First report of field resistance by the stem borer, Busseola fusca (Fuller) to Bt-transgenic maize*. South African Journal of Plant and Soil, 2007. **24**(3): p. 147-151.
93. Gassmann, A.J., et al., *Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22629.
94. Tabashnik, B.E., Cushing, N.L., Finson, N., Johnson, M.W., *Field development of resistance to Bacillus thuringiensis in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae)*. J. Econ. Entomol., 1990. **83**: p. 1671-1676.
95. Janmaat, A.F. and J. Myers, *Rapid evolution and the cost of resistance to Bacillus thuringiensis in greenhouse populations of cabbage loopers, Trichoplusia ni*. Proc Biol Sci, 2003. **270**(1530): p. 2263-70.
96. Oppert, B., et al., *Proteinase-mediated insect resistance to Bacillus thuringiensis toxins*. J Biol Chem, 1997. **272**(38): p. 23473-6.
97. Ma, G., et al., *Is the mature endotoxin Cry1Ac from Bacillus thuringiensis inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant Helicoverpa armigera larvae?* Insect Biochem Mol Biol, 2005. **35**(7): p. 729-39.
98. Gunning, R.V., et al., *New resistance mechanism in Helicoverpa armigera threatens transgenic crops expressing Bacillus thuringiensis Cry1Ac toxin*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(5): p. 2558-63.
99. Hernandez-Martinez, P., et al., *Constitutive activation of the midgut response to Bacillus thuringiensis in Bt-resistant Spodoptera exigua*. PLoS One, 2010. **5**(9).
100. Griffiths, J.S. and R.V. Aroian, *Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins*. Bioessays, 2005. **27**(6): p. 614-24.
101. Khajuria, C., et al., *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, 2011. **6**(8): p. e23983.
102. Yang, Y., *Molecular Mechanisms of Bacillus thuringiensis Resistance in the Sugarcane Borer*. . 2011, Louisiana State Univ. .
103. Yang, Y., et al., *Molecular characterization and RNA interference of three midgut aminopeptidase N isozymes from Bacillus thuringiensis-susceptible and -resistant strains of sugarcane borer, Diatraea saccharalis*. Insect Biochem Mol Biol, 2010. **40**(8): p. 592-603.
104. Xu, X., L. Yu, and Y. Wu, *Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac {delta}-endotoxin of Bacillus thuringiensis in Helicoverpa armigera*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(2): p. 948-54.
105. Zhang, S., et al., *Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with Helicoverpa armigera resistance to Bacillus thuringiensis Cry1Ac toxin*. Insect Biochem Mol Biol, 2009. **39**(7): p. 421-9.
106. Jurat-Fuentes, J.L., et al., *Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from Bacillus thuringiensis*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17606.

107. Tiewisiri, K. and P. Wang, *Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to Bacillus thuringiensis toxin Cry1Ac in cabbage looper*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(34): p. 14037-42.
108. Franklin, M.T., et al., *Modified Bacillus thuringiensis toxins and a hybrid B. thuringiensis strain counter greenhouse-selected resistance in Trichoplusia ni*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(17): p. 5739-41.
109. Bravo, A. and M. Soberon, *How to cope with insect resistance to Bt toxins?* Trends Biotechnol, 2008. **26**(10): p. 573-9.
110. Gatehouse, J.A., *Biotechnological prospects for engineering insect-resistant plants*. Plant Physiol, 2008. **146**(3): p. 881-7.
111. Soberon, M., et al., *Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance*. Science, 2007. **318**(5856): p. 1640-2.
112. Zhao, J.Z., et al., *Transgenic plants expressing two Bacillus thuringiensis toxins delay insect resistance evolution*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(12): p. 1493-7.
113. Tabashnik, B.E., et al., *Control of resistant pink bollworm (Pectinophora gossypiella) by transgenic cotton that produces Bacillus thuringiensis toxin Cry2Ab*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(8): p. 3790-4.
114. Mandal, C.C., et al., *Prediction-based protein engineering of domain I of Cry2A entomocidal toxin of Bacillus thuringiensis for the enhancement of toxicity against lepidopteran insects*. Protein Eng Des Sel, 2007. **20**(12): p. 599-606.
115. Gouffon, C., et al., *Binding sites for Bacillus thuringiensis Cry2Ae toxin on heliothine brush border membrane vesicles are not shared with Cry1A, Cry1F, or Vip3A toxin*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(10): p. 3182-8.
116. Gonzalez-Cabrera, J., et al., *Binding of Bacillus thuringiensis toxins in resistant and susceptible strains of pink bollworm (Pectinophora gossypiella)*. Insect Biochem Mol Biol, 2003. **33**(9): p. 929-35.
117. Hernandez-Rodriguez, C.S., et al., *Specific binding of Bacillus thuringiensis Cry2A insecticidal proteins to a common site in the midgut of Helicoverpa species*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(24): p. 7654-9.
118. Caccia, S., et al., *Binding site alteration is responsible for field-isolated resistance to Bacillus thuringiensis Cry2A insecticidal proteins in two Helicoverpa species*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e9975.
119. Karim, S. and D.H. Dean, *Toxicity and receptor binding properties of Bacillus thuringiensis delta-endotoxins to the midgut brush border membrane vesicles of the rice leaf folders, Cnaphalocrocis medinalis and Marasmia patnalis*. Curr Microbiol, 2000. **41**(4): p. 276-83.
120. Ruiz de Escudero, I., et al., *Potential of the Bacillus thuringiensis toxin reservoir for the control of Lobesia botrana (Lepidoptera: Tortricidae), a major pest of grape plants*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(1): p. 337-40.
121. Shahid Karim, S.R., F. Gould, and Donald H. Dean, *Determination of Receptor Binding Properties of Bacillus thuringiensis d-Endotoxins to Cotton Bollworm (Helicoverpa zea) and Pink Bollworm (Pectinophora gossypiella) Midgut Brush Border Membrane Vesicles*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2000. **67**: p. 198-216.
122. Liao, C., D.G. Heckel, and R. Akhurst, *Toxicity of Bacillus thuringiensis insecticidal proteins for Helicoverpa armigera and Helicoverpa punctigera (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton*. J Invertebr Pathol, 2002. **80**(1): p. 55-63.
123. Wu, X., et al., *Susceptibility of Cry1Ab-resistant and -susceptible sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to four Bacillus thuringiensis toxins*. J Invertebr Pathol, 2009. **100**(1): p. 29-34.
124. Mahon, R.J., et al., *Resistance to Bacillus thuringiensis toxin Cry2Ab in a strain of Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia*. J Econ Entomol, 2007. **100**(3): p. 894-902.
125. Luo, S., et al., *Cross-resistance studies of Cry1Ac-resistant strains of Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry2Ab*. J Econ Entomol, 2007. **100**(3): p. 909-15.
126. Rajagopal, R., et al., *Resistance of Helicoverpa armigera to Cry1Ac toxin from Bacillus thuringiensis is due to improper processing of the protoxin*. Biochem J, 2009. **419**(2): p. 309-16.

127. Akhurst, R.J., et al., *Resistance to the Cry1Ac delta-endotoxin of Bacillus thuringiensis in the cotton bollworm, Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae)*. J Econ Entomol, 2003. **96**(4): p. 1290-9.
128. Yang, Y.H., et al., *Introgression of a disrupted cadherin gene enables susceptible Helicoverpa armigera to obtain resistance to Bacillus thuringiensis toxin Cry1Ac*. Bull Entomol Res, 2009. **99**(2): p. 175-81.
129. Anilkumar, K.J., et al., *Production and characterization of Bacillus thuringiensis Cry1Ac-resistant cotton bollworm Helicoverpa zea (Boddie)*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(2): p. 462-9.
130. Brevault, T., et al., *Potential shortfall of pyramided transgenic cotton for insect resistance management*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(15): p. 5806-11.
131. Burd AD, B.J., Van Duyn JW, Gould F. *Resistance of bollworm, Helicoverpa zea, to Cry1A(c) toxin*. in *Proceedings, 2000 Beltwide Cotton Conferences*. 2000. San Antonio, TX,.
132. Gould, F., et al., *Broad-spectrum resistance to Bacillus thuringiensis toxins in Heliothis virescens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(17): p. 7986-90.
133. Jurat-Fuentes, J.L., F.L. Gould, and M.J. Adang, *Dual resistance to Bacillus thuringiensis Cry1Ac and Cry2Aa toxins in Heliothis virescens suggests multiple mechanisms of resistance*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(10): p. 5898-906.
134. Gould F, A.A., Raynolds A, Bumgarner L, Moar W, *Selection and genetic analysis of Heliothis virescens (Lepidoptera, Noctuidae) strain with high levels of resistance to Bacillus thuringiensis toxins*. J Econ Entomol, 1995. **88**(6): p. 1545-1559.
135. Kota, M., et al., *Overexpression of the Bacillus thuringiensis (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 1840-5.
136. Tabashnik, B.E., et al., *Asymmetrical cross-resistance between Bacillus thuringiensis toxins Cry1Ac and Cry2Ab in pink bollworm*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(29): p. 11889-94.
137. Gong, Y., et al., *Characterization of resistance to Bacillus thuringiensis toxin Cry1Ac in Plutella xylostella from China*. J Invertebr Pathol, 2010. **104**(2): p. 90-6.
138. Tabashnik, B.E., et al., *Cross-resistance of pink bollworm (Pectinophora gossypiella) to Bacillus thuringiensis toxins*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(10): p. 4582-4.
139. Tabashnik, B.E., et al., *Resistance to Toxins from Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki Causes Minimal Cross-Resistance to B. thuringiensis subsp. aizawai in the Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae)*. Appl Environ Microbiol, 1993. **59**(5): p. 1332-5.
140. Liu, Y.B., et al., *Cross-resistance and stability of resistance to Bacillus thuringiensis toxin Cry1C in diamondback moth*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(7): p. 3216-9.
141. Gao, Y., et al., *Cry2Ab tolerance response of Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Cry1Ac cotton planting region*. J Econ Entomol, 2009. **102**(3): p. 1217-23.
142. Widner, W.R. and H.R. Whiteley, *Two highly related insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki possess different host range specificities*. J Bacteriol, 1989. **171**(2): p. 965-74.
143. Crickmore, N. and D.J. Ellar, *Involvement of a possible chaperonin in the efficient expression of a cloned CryIIA delta-endotoxin gene in Bacillus thuringiensis*. Mol Microbiol, 1992. **6**(11): p. 1533-7.
144. Leigh English, H.L.R., Michael A. Von Tersch, Caroline A. Kulesza, Dirk Ave, Dolores Coyle, Christine S. Jany, Stephen L. Slatin, *Mode of action of CryIIA: a Bacillus thuringiensis delta-endotoxin*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1994. **24**(10): p. 1025-1035.
145. Liang, Y. and D.H. Dean, *Location of a lepidopteran specificity region in insecticidal crystal protein CryIIA from Bacillus thuringiensis*. Mol Microbiol, 1994. **13**(4): p. 569-75.
146. Audtho, M., et al., *Production of chymotrypsin-resistant Bacillus thuringiensis Cry2Aa1 delta-endotoxin by protein engineering*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(10): p. 4601-5.
147. Brandt, S.L., et al., *Interaction of two Bacillus thuringiensis delta-endotoxins with the digestive system of Lygus hesperus*. Curr Microbiol, 2004. **48**(1): p. 1-9.
148. Lin, Y., G. Fang, and F. Cai, *The insecticidal crystal protein Cry2Ab10 from Bacillus thuringiensis: cloning, expression, and structure simulation*. Biotechnol Lett, 2008. **30**(3): p. 513-9.
149. Jain, D., et al., *Cloning, characterization, and expression of a new cry2Ab gene from Bacillus thuringiensis strain 14-1*. Appl Biochem Biotechnol, 2006. **128**(3): p. 185-94.



150. McNeil, B.C. and D.H. Dean, *Bacillus thuringiensis Cry2Ab is active on Anopheles mosquitoes: single D block exchanges reveal critical residues involved in activity*. FEMS Microbiol Lett, 2011. **325**(1): p. 16-21.
151. Ohsawa, M., et al., *A 50-kilodalton Cry2A peptide is lethal to Bombyx mori and Lymantria dispar*. Appl Environ Microbiol, 2012. **78**(13): p. 4755-7.
152. Shahid Karima, S. Riazuddin, F. Gould, Donald H. Deane, *Determination of Receptor Binding Properties of Bacillus thuringiensis  $\delta$ -Endotoxins to Cotton Bollworm (Helicoverpa zea) and Pink Bollworm (Pectinophora gossypiella) Midgut Brush Border Membrane Vesicles*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2000. **67**(3): p. 198-216.
153. Cioffi, M. and M.G. Wolfersberger, *Isolation of separate apical, lateral and basal plasma membrane from cells of an insect epithelium. A procedure based on tissue organization and ultrastructure*. Tissue Cell, 1983. **15**(5): p. 781-803.
154. Du, C. and K.W. Nickerson, *The Bacillus thuringiensis insecticidal toxin binds biotin-containing proteins*. Appl Environ Microbiol, 1996. **62**(8): p. 2932-9.
155. Masson, L., et al., *The CryIA(c) receptor purified from Manduca sexta displays multiple specificities*. J Biol Chem, 1995. **270**(35): p. 20309-15.
156. Jurat-Fuentes, J.L. and M.J. Adang, *A proteomic approach to study Cry1Ac binding proteins and their alterations in resistant Heliothis virescens larvae*. J Invertebr Pathol, 2007. **95**(3): p. 187-91.
157. Mooseker, M.S., *Organization, chemistry, and assembly of the cytoskeletal apparatus of the intestinal brush border*. Annu Rev Cell Biol, 1985. **1**: p. 209-41.
158. Cancino-Rodezno, A., et al., *Comparative proteomic analysis of Aedes aegypti larval midgut after intoxication with Cry11Aa toxin from Bacillus thuringiensis*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37034.
159. Beyenbach, K.W. and H. Wiczonek, *The V-type H<sup>+</sup> ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation*. J Exp Biol, 2006. **209**(Pt 4): p. 577-89.
160. Nishi, T. and M. Forgac, *The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases--nature's most versatile proton pumps*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(2): p. 94-103.
161. Wiczonek, H., et al., *Animal plasma membrane energization by proton-motive V-ATPases*. Bioessays, 1999. **21**(8): p. 637-48.
162. Merzendorfer, H., et al., *The multigene family of the tobacco hornworm V-ATPase: novel subunits a, C, D, H, and putative isoforms*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1467**(2): p. 369-79.
163. Knight, A.J. and C.A. Behm, *Minireview: the role of the vacuolar ATPase in nematodes*. Exp Parasitol, 2012. **132**(1): p. 47-55.
164. Castagna, M., et al., *Cloning and characterization of a potassium-coupled amino acid transporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 5395-400.
165. Candas, M., et al., *Insect resistance to Bacillus thuringiensis: alterations in the indianmeal moth larval gut proteome*. Mol Cell Proteomics, 2003. **2**(1): p. 19-28.
166. Knight, P.J., J. Carroll, and D.J. Ellar, *Analysis of glycan structures on the 120 kDa aminopeptidase N of Manduca sexta and their interactions with Bacillus thuringiensis Cry1Ac toxin*. Insect Biochem Mol Biol, 2004. **34**(1): p. 101-12.
167. Sangadala, S., et al., *A mixture of Manduca sexta aminopeptidase and phosphatase enhances Bacillus thuringiensis insecticidal CryIA(c) toxin binding and 86Rb(+)-K<sup>+</sup> efflux in vitro*. J Biol Chem, 1994. **269**(13): p. 10088-92.
168. Contreras, E., C. Rausell, and M.D. Real, *Proteome response of Tribolium castaneum larvae to Bacillus thuringiensis toxin producing strains*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e55330.
169. Lee, M.K., et al., *The mode of action of the Bacillus thuringiensis vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(8): p. 4648-57.
170. Singh, G., et al., *Interaction of Bacillus thuringiensis vegetative insecticidal protein with ribosomal S2 protein triggers larvicidal activity in Spodoptera frugiperda*. Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(21): p. 7202-9.