



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“Estudio de estrategias para la clonación y expresión de toxinas
Cry1AMod de *Bacillus thuringiensis*”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

DIANA LAURA MARTÍNEZ DE CASTRO JIMÉNEZ

TUTOR PRINCIPAL

Dra. María Alejandra Bravo de la Parra (IBT, UNAM).

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Ernesto Ortiz Suri (IBT, UNAM).
Dr. Alfredo Torres Larios (IFC, UNAM).

MÉXICO, D. F. Mayo, 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 Breve historia de Bt.....	12
1.2 Características generales de Bt.....	13
1.3 Regulación y expresión de genes <i>cry</i>	14
1.4 Toxinas Cry de 3 dominios.....	16
1.5 Mecanismo de acción de las toxinas Cry de 3 dominios	18
1.6 Mecanismos de resistencia en insectos.....	20
1.7 Estrategias para contender con la resistencia de insectos.....	23
2. ANTECEDENTES.....	25
2.1 Mecanismo de acción de las toxinas Cry1AMod.....	25
2.2 Toxicidad de Cry1AMod.....	26
2.3 Procesamiento del extremo N-terminal.....	28
2.4 Expresión de genes <i>cry</i> bajo diferentes promotores.....	30
3. JUSTIFICACIÓN.....	33
4. HIPÓTESIS.....	33
5. OBJETIVOS.....	33
5.1 Objetivo general.....	33
5.2 Objetivos particulares.....	33
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	34
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
7.1 Cepas bacterianas.....	35
7.2 Diseño de oligonucleótidos.....	35
7.3 Amplificaciones de DNA por PCR	37
7.4 PCR mutagénico.....	38
7.5 Ligación de DNA.....	39
7.6 Electroforesis de DNA.....	39
7.7 Purificación de plásmidos bacterianos.....	39
7.8 Purificación de DNA a partir de gel de agarosa.....	39
7.9 Obtención de células calcio competentes <i>E. coli</i> DH5 α , C41 (DE3) y C43 (DE3).....	40
7.10 Obtención de células electrocompetentes Bt 407 <i>cry</i>	40
7.11 Transformación de células calcio competentes <i>E. coli</i> DH5 α , C41 (DE3) y C43 (DE3).....	41
7.12 Transformación de células electrocompetentes.....	41
7.13 PCR en colonia.....	41
7.14 Secuenciación de DNA.....	43
7.15 Obtención de la suspensión de espora-cristal.....	43

7.16 Cuantificación de proteínas.....	44
7.17 Electroforesis de proteínas.....	44
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
8.1 Construcción del vector de expresión pHT315-P1P2-Kan.....	45
8.1.1 Amplificación de fragmentos por PCR.....	46
8.1.2 Ensamblaje por PCR.....	46
8.2 Estrategia A: clonación en cepas de <i>E. coli</i>	50
8.2.1 <i>E. coli</i> DH5 α	52
8.2.2 <i>E. coli</i> C41 (DE3) y C43 (DE3).....	56
8.3 Estrategia B: Expresión de las variantes Mod bajo los promotores <i>Pcry3A</i> y <i>PexsY</i>	58
8.3.1 Promotor <i>Pcry3A</i>	58
8.3.1.1 Construcción del vector de expresión pHT315- <i>Pcry3A</i> -Kan-C730S y clonación de las variantes Mod.....	59
8.3.1.2 Expresión de las variantes Mod en Bt.....	62
8.3.1.3 Solubilización de las variantes Mod en Bt.....	63
8.3.2 Promotor <i>PexsY</i>	64
8.3.2.1 Mutagénesis-delección.....	64
8.4 Estrategia C: Clonación directa en Bt.....	66
9. CONCLUSIONES.....	70
10. PERSPECTIVAS.....	71
11. ANEXO.....	72
12. REFERENCIAS.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	<i>Bacillus thuringiensis</i> .
Figura 2	Fases del proceso de esporulación.
Figura 3	Bloques conservados entre proteínas Cry.
Figura 4	Comparación de la estructura terciaria de las toxinas Cry-3d.
Figura 5	Modelo de formación de poro de la toxina Cry1Ab en <i>M. sexta</i> .
Figura 6	Modelo de inducción de señalización intracelular.
Figura 7	Mecanismos de resistencia a toxinas Cry.
Figura 8	Formaciones de oligómero por toxinas Bt nativas y modificadas.
Figura 9	Gráficas del bioensayo retando con las toxinas Cry1Ac silvestre y Cry1AcMod a larvas de <i>P. xylostella</i> .
Figura 10	Gráficas del bioensayo retando con las toxinas Cry1Ac silvestre y Cry1AcMod a larvas de <i>T. ni</i> .
Figura 11	Gráficas del bioensayo retando con las toxinas Cry1Ac silvestre y Cry1AcMod a larvas de <i>P. gossypiella</i> .
Figura 12	SDS-PAGE al 12% que muestra la co-expresión de HaCa1 y la toxina Cry1Ac en dos cultivos distintos.
Figura 13	SDS-PAGE del contenido de endotoxina en las cepas transformantes BMB171 FBK y BMB171 F31.
Figura 14	SDS-PAGE de la expresión de Cry1Ac en las cepas HD3A-1Ac y HD8E-1Ac.
Figura 15	SDS-PAGE de la expresión de Cry1Ab17 producida en <i>E. coli</i> BL-21.
Figura 16	Diagrama de flujo de la estrategia propuesta.
Figura 17	Representación esquemática del vector de expresión pHT315-P1P2-Kan.
Figura 18	Representación de la estrategia por ensamblaje por PCR.
Figura 19	Linearización de los plásmidos.
Figura 20	Resultado del ensamble por PCR del promotor P1P2 con el casete de kanamicina.
Figura 21	Esquema de las variantes Mod.
Figura 22	Resultado de la amplificación por PCR de cada variante Mod.
Figura 23	Análisis por patrón de restricción de las construcciones: Cry1Ac silvestre, Mod ⁵¹ VPG y Mod ⁶⁹ GPS en <i>E. coli</i> DH5 α .
Figura 24	SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie. Proteína total de cultivos esporulados de Bt.
Figura 25	Análisis por patrón de restricción de las construcciones: Cry1Ac silvestre, Mod ⁵¹ VPG y Mod ⁶⁹ GPS en <i>E. coli</i> C41 (DE3) y C43 (DE3).
Figura 26	Western blot contra las proteínas sintetizadas en cepas <i>E. coli</i> y Bt incubadas con anticuerpos específicos contra Cry2Ab.

Figura 27 Representación esquemática del vector de expresión bajo la regulación del promotor *Pcry3A*.

Figura 28 SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie. Proteína total de cultivos esporulados de Bt.

Figura 29 SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomassie. Solubilización de las proteínas bajo la regulación del promotor *PCry3A*.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Factores de transcripción involucrados en la expresión de genes <i>cry</i> .
Tabla 2	Especies de insectos-plaga resistentes aislados en campo.
Tabla 3	Análisis del procesamiento proteolítico de la toxina Cry1Ac con el jugo gástrico de los insectos <i>Pieris brassicae</i> y <i>Mamestra brassicae</i> .
Tabla 4	Cepas bacterianas.
Tabla 5	Lista de oligonucleótidos.
Tabla 6	Condiciones de PCR.
Tabla 7	Condiciones del PCR mutagénico.
Tabla 8	Tratamiento del producto de PCR mutagénico.
Tabla 9	Condiciones de ligación.
Tabla 10	Condiciones de PCR en colonia de <i>E. coli</i> .
Tabla 11	Condiciones de PCR en colonia de Bt.
Tabla 12	Descripción de las enzimas de restricción y tamaño esperado.
Tabla 13	Resultado de la secuenciación de DNA perteneciente a las construcciones Mod ⁵¹ VPG y Mod ⁶⁹ GPS.
Tabla 14	Proteínas del género <i>Bacillus</i> expresadas en <i>E. coli</i> C43 (DE3) y C44 (DE3).
Tabla 15	Descripción de las enzimas de restricción y tamaño esperado.
Tabla 16	Resultado de la secuenciación del DNA perteneciente a las variantes Mod bajo el promotor <i>PexsY</i> .
Tabla 17	Condiciones de ligación-A.
Tabla 18	Número de colonias resultantes de la transformación directa-A.
Tabla 19	Condiciones de ligación-B.
Tabla 20	Número de colonias resultantes de la transformación directa-B.

ABREVIATURAS

APN	Aminopeptidasa-N
ALP	Fosfatasa alcalina
BrEt	Bromuro de etidio
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
cAMP	AMP cíclico
C-terminal	Carboxilo terminal
Cry1AMod	Toxinas Cry1A modificadas
Cultivo GM	Cultivo Genéticamente Modificado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO₆₀₀	Densidad óptica a 600 nanómetros
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
kDa	Kilodaltones
Kb	Kilo base (s) = (1000 pares de bases)
L	Litro
LB	Luria-Bertani
LC₅₀	<i>Lethal concentration</i> ₅₀ (en español, concentración letal ₅₀)
mA	Miliamperios
mL	Mililitro
nt	Nucleótido
N-terminal	Amino terminal
pb	Pares de bases
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	Potencial de hidrógeno
pp	Polipropileno
rpm	Revoluciones por minuto
OF	Oligo <i>forwad</i>
OR	Oligo <i>reverse</i>
V	Volts
µg	Microgramo
µL	Microlitro
W	Watt o Vatio

RESUMEN

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram-positiva que durante su fase de esporulación produce las proteínas Cry. Estas proteínas presentan actividad insecticida contra especies de insectos plaga de relevancia comercial. Las proteínas Cry son biodegradables e inocuas para mamíferos, incluyendo humanos (Bravo *et al.*, 2007).

El mecanismo de acción descrito para las toxinas Cry1A comienza cuando las protoxinas son activadas en el intestino de las larvas susceptibles liberando el fragmento tóxico en forma de monómero. Posteriormente la toxina se une a receptores que provocan cambios conformacionales en la proteína induciendo su oligomerización. Esta estructura oligomérica tiene la capacidad de insertarse en la membrana intestinal del insecto, formando poros iónicos que lisan a las células del intestino, ocasionando finalmente la muerte del insecto (Gómez *et al.*, 2002b).

La principal amenaza para la eficacia de las toxinas Cry es la aparición de insectos resistentes en el campo. Una manera de contender la resistencia fue el diseño de las toxinas Cry1AMod (Cry1AbMod y Cry1AcMod); ambas proteínas son modificadas porque carecen de los primeros 56 residuos de aminoácidos, que corresponden a la hélice $\alpha 1$ y la mitad de la hélice $\alpha 2a$ del dominio I, en contraste con las toxinas Cry1A silvestres. Se demostró que las toxinas Cry1AMod son capaces de oligomerizar en ausencia del receptor caderina y se ha comprobado que matan eficientemente a insectos resistentes a toxinas Cry silvestres (Soberón *et al.*, 2007). Sin embargo, en algunas especies de insectos susceptibles, la potencia de las toxinas Cry1AMod se encuentra considerablemente reducida (Tabashnik *et al.*, 2011).

Un objetivo importante para la utilización de estas toxinas en el campo es su optimización con la finalidad de abatir plagas de insectos susceptibles y resistentes. En el presente trabajo se emplearon diversas estrategias para clonar y expresar diferentes variantes de la toxina Cry1AcMod con el propósito de optimizar su actividad insecticida. Se planteó la obtención de ocho variantes con diferentes deleciones en el extremo N-terminal. Para cumplir con este objetivo, se diseñó y construyó un vector que permitiera la correcta clonación y expresión de las variantes bajo la regulación del promotor P1P2, incorporando un casete de kanamicina entre el promotor y la región C-terminal que facilitara la selección de las variantes de manera expedita.

Se inició con la clonación de dos diferentes versiones Cry1AcMod, denominadas ⁵¹VPG y ⁶⁹GPS que se diferencian entre ellas en el extremo N-terminal. Se incluyó el control positivo Cry1Ac silvestre. Se utilizaron tres diferentes cepas de *E. coli* para clonar estas variantes. Encontramos que distintas cepas de *E. coli* realizan diversos rearrreglos en

el DNA plasmídico de las variantes de Cry1AcMod ocasionando que no expresen proteína tanto en *E. coli* como en Bt, caso contrario al control positivo Cry1Ac silvestre. Este tipo de eventos se han reportado para otros genes cuando las proteínas que se expresan en *E. coli* resultan tóxicas para la cepa receptora.

Por este motivo, se propuso utilizar dos promotores alternativos para la clonación y expresión de las variantes, la elección de ellos se llevó a cabo bajo la premisa de que no se expresaran en *E. coli* y que sí lo hicieran en Bt. El primero de ellos es el promotor constitutivo del gen *cry3A*; en esta estrategia se construyó un nuevo vector para clonar y expresar las proteínas variantes de Cry1AcMod. En el diseño de este vector se incluyó el promotor *Pcry3A* y una mutación puntual en el residuo C730S del extremo C-terminal de la toxina Cry1Ac, que incrementa la solubilidad de las proteínas.

Se obtuvieron las variantes ⁵¹VPG y ⁶⁹GPS en *E. coli* sin errores en su secuencia nucleotídica. El DNA plasmídico resultante se utilizó para transformar en *Bacillus thuringiensis* donde la variante ⁵¹VPG se expresa en el tamaño esperado. Sin embargo, la variante ⁶⁹GPS no se expresó. En el análisis de la solubilidad de la variante ⁵¹VPG se encontró que fue muy baja, por lo tanto no se considera una estrategia óptima para la generación de futuras variantes Cry1AcMod. Nuevos trabajos en el laboratorio indican que mutaciones en otros residuos de cisteína como el C654S o fusiones con el C-terminal de la toxina Cry1C permiten expresar proteínas Cry1AbMod solubles bajo la regulación del promotor *Pcry3A*, por lo que esto sería una estrategia a probar en el futuro.

El segundo promotor que se utilizó en este trabajo fue el promotor *PesxY*, dependiente del factor σ^k de esporulación. Sin embargo, se encontró que este promotor permite la expresión en *E. coli* y también se generaron rearrreglos en el DNA plasmídico de las variantes. La expresión de las variantes bajo el promotor *PesxY* no resultó ser funcional.

Como último objetivo se realizó la clonación directa de las variantes ⁵¹VPG y ⁶⁹GPS, además del control Cry1Ac silvestre en células acristalíferas de Bt. Sin embargo, la eficiencia de transformación directa en Bt es muy baja por lo que las transformaciones de las variantes y la construcción Cry1Ac silvestre no fueron positivas. Es necesario optimizar las condiciones de la clonación directa en Bt.

Por lo tanto, se concluye que se obtuvieron de manera exitosa los vectores de expresión: pHT315-P1P2-Kan y pHT315-Pcry3A-Kan-C730S. Con el vector pHT315-P1P2-Kan se obtuvo la correcta expresión de la toxina Cry1Ac silvestre en la cepa *E. coli* DH5 α . El vector pHT315-Pcry3A-Kan-C730S es funcional ya que permitió la expresión de la variante ⁵¹VPG en la cepa *E. coli* DH5 α .

La generación de las variantes de Cry1AcMod es importante para poder definir si existe un extremo N-terminal óptimo para obtener proteínas con una mayor actividad insecticida hacia los insectos susceptibles. Al final de este trabajo se proponen varias estrategias que permitirán lograr estas construcciones.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (Bt) is a Gram-positive bacterium that during sporulation phase produces the Cry proteins. These proteins exhibit insecticidal activity against different insect pests of commercial importance. Cry proteins are biodegradable and innocuous to mammals, including humans (Bravo *et al.*, 2007).

The mechanism of action described for the Cry1A toxins begins when the protoxins are activated in the gut of the susceptible larvae releasing the toxic fragment as a monomer. Subsequently the toxin binds to receptors that cause conformational changes in the protein inducing their oligomerization. This oligomeric structure has the ability to insert into the insect gut membrane forming ion pores that will break down intestinal cells, finally causing the insect death (Gómez *et al.*, 2002b).

The main threat to the effectiveness of Cry toxins is the emergence of resistant insects in the field. A strategy to contend with resistance was the design of Cry1AMod toxins (Cry1AbMod and Cry1AcMod), both proteins are modified because lack helix $\alpha 1$ and half of the helix $\alpha 2a$ from domain I. It was demonstrated that Cry1A toxins are capable to oligomerize in the absence of cadherin receptor and was found that they effectively kill resistant insects to wild Cry toxins (Soberon *et al.*, 2007). However, in some species of susceptible insects, the potency of the Cry1AMod toxins is considerably reduced (Tabashnik *et al.*, 2011).

An important aim for the utilization of these toxins in the field is their optimization in order to kill both susceptible and resistant insect pests. In the present work diverse strategies were used for cloning and expressing different variants of the Cry1AcMod toxin in order to optimize their insecticidal activity. We designed eight variants with different deletions in the N-terminal end. To carry out this strategy the first step was to design and construct a vector that would allow us the correct cloning and expression of the new variants under regulation of P1P2 promoter, incorporating a kanamycin cassette between the promoter and the C-terminal end to facilitate the expeditious selection of the variants.

We initiated with the cloning of two different versions Cry1AcMod, called ⁶⁹GPS and ⁵¹VPG that differ in their N-terminal start. Wild type Cry1Ac was included as a positive control. Three different *E. coli* strains were used to clone these variants. We found that different strains of *E. coli* perform diverse rearrangements in the plasmid DNA of the Cry1AcMod variants arresting protein expression in *E. coli* and Bt, in contrast to the wild type Cry1Ac positive control. Such events have been reported for other genes when toxic proteins to *E. coli* strains are expressed.

Therefore it was proposed to use two alternative promoters for cloning and expression of the variants, they were selected under the premise that they were inactive *E. coli* and remain functional in Bt. The first one is the *cry3a* promoter; in this strategy a new vector was constructed to cloning and expressing the Cry1AcMod variants. In the design of this vector, the kanamycin cassette and the C-terminus of the toxin Cry1Ac containing the C730S mutation were cloned in pHT315, since it was described it would help to increase protein solubility.

Cry1AcMod variants were cloned in *E. coli* without changes in their nucleotide sequences. The resultant plasmid DNA was used to transform *Bacillus thuringiensis*, where ⁵¹VPG variant is expressed in the expected molecular size. However ⁶⁹GPS variant did not express protein. The solubility analysis showed that ⁵¹VPG variant was less soluble than the wild type protein; therefore expression under the regulation of *Pcry3A* is not considered an optimal strategy for generating additional Cry1AcMod variants. Recent studies indicate that mutations in other cysteine residues such as C654S or fusions to the C-terminus of Cry1C allow the expression of soluble protein Cry1AbMod under the regulation of *Pcry3A*, so this would be a strategy to try in the future. The second promoter that was used in this study was *PesxY* promoter that is dependent in σ^k factor. However it was found that this promoter allows expression in *E. coli* and therefore also generated plasmid DNA rearrangements in the Cry1AcMod variants.

The direct cloning of Cry1AcMod variants directly in Bt cells was also explored. However the efficiency of direct transformation in Bt is very low so that the transformations of the variants and construction wild type Cry1Ac constructs was not successful. It is necessary to optimize the conditions for the direct cloning in Bt.

Therefore, we conclude that expression vectors: pHT315-P1P2-Kan and pHT315-Pcry3A-Kan-C730S were successfully obtained. With the vector pHT315-P1P2-Kan the correct expression of the Cry1Ac wild type toxin in *E. coli* α DH5 strain was obtained. The pHT315-Pcry3A-Kan-C730S vector is functional because it allowed the expression of ⁵¹VPG variant in *E. coli* DH5 α strain.

The generation of new variants of Cry1AcMod is important to define whether there is an optimal N-terminal to obtain proteins with a higher insecticidal activity towards susceptible insects. At the end of this work we propose several strategies that will allow the constructing these variants.

1. INTRODUCCIÓN

Un problema relevante de la agricultura consiste en las pérdidas considerables que generan el ataque de plagas a las cosechas (Tabashnik *et al.*, 2009). Una forma de controlar este ataque ha sido la utilización de insecticidas químicos; en un principio resultaron ser rápidos, baratos y con un amplio espectro de acción (Spiegel, 1998; Gunnell *et al.*, 2007). No obstante, este tipo de insecticidas son altamente perjudiciales para la salud humana y los ecosistemas (Dawson *et al.*, 2010; Burns *et al.*, 2013; Sparks, 2013); además, por su persistencia en el medio ambiente favorecen la selección de insectos plaga resistentes a ellos (Tabashnik *et al.*, 1994; 2009).

Una alternativa al uso de los insecticidas químicos, ha sido el desarrollo de los bioinsecticidas o plantas transgénicas que producen las proteínas Cry; los cuales son amigables con el ambiente y han resultado ser altamente eficaces en el control de plagas (Schnepf *et al.*, 1998; Qaim y Zilberman, 2003). El empleo de esta tecnología exhibe muchos beneficios, ya que las proteínas Cry son altamente específicas contra insectos blanco, completamente biodegradables, inocuas para humanos, vertebrados y plantas. Son efectivas para el control de plagas de plantas de importancia agrícola, así como para controlar a insectos vectores de enfermedades humanas (Bravo *et al.*, 2007).

1.1 Breve historia de Bt

En el año 1901 el científico japonés Shigetane Ishiwata investigaba las causas de la denominada “enfermedad de sotto”, la cual mataba grandes poblaciones del gusano de seda (*Bombix mori*); él encontró que el agente causal era una bacteria que logró aislar y a la cual nombró *Bacillus sotto* (Ishiwata, 1905). Posteriormente, en el año 1911 el científico alemán Ernst Berliner aisló una bacteria que mataba a la polilla mediterránea de la harina (*Ephestia kuehniella*); él nombro a esta bacteria *Bacillus thuringiensis*, porque la polilla se encontró en la ciudad alemana Thuringia (Berliner, 1911). En 1915 Berliner reportó que después de finalizar su crecimiento vegetativo, el bacilo contiene además de la espora una inclusión paraesporal (Berliner, 1915).

El primer bioinsecticida comercial basado en Bt se le denominó “Sporina”, se produjo en Francia en 1938 por el Laboratorio Libec y se utilizó para controlar las polillas de la harina (Entwistle *et al.*, 1993). Posteriormente el progreso de este producto se detuvo, debido a los avances en la investigación de insecticidas químicos como el DDT (dicloro difenil tricloroetano). Durante la Segunda Guerra Mundial, científicos alemanes comenzaron a producir insecticidas organofosforados y como consecuencia se vio limitado el interés por los bioinsecticidas (Müller, 1995). Después de la Segunda Guerra Mundial se dio una gran expansión de insecticidas químicos, los efectos se vieron reflejados en daños

en la salud humana y se retomó la investigación en el campo de bioinsecticidas (Sanchis, 2011).

En 1953 el investigador Christopher Hannay reportó que las esporas de *B. thuringiensis* estaban acompañadas de cristales en forma de diamante (Hannay, 1953). Un año más tarde, Thomas Angus demostró que la toxicidad en los insectos estaba asociada principalmente con las inclusiones cristalinas del bacilo y que para ser activas requerían ser solubilizadas en soluciones alcalinas o con el jugo intestinal del insecto (Angus, 1954).

En los Estados Unidos, Bt se manufacturó comercialmente en 1958, y para el año de 1961 los bioinsecticidas fueron registrados por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA). En el año 1996 se aprobó la utilización de cultivos genéticamente modificados resistentes a insectos, conocidos como cultivos-Bt los cuales producen proteínas Cry. A partir de esta fecha los cultivos-Bt se han expandido mundialmente; estos cultivos han demostrado ser eficientes y han ayudado a reducir el uso de los insecticidas químicos (Qaim *et al.*, 2003; Kleter *et al.*, 2007).

1.2 Características generales de Bt

Bt es un bacilo Gram-positivo, aerobio estricto, de flagelación peritrica, que mide de 3 a 5 μm de largo por 1 a 1.2 μm de ancho. Es considerado ubicuo, ya que se han aislado cepas de Bt en todo el mundo en diversos hábitats, incluyendo suelo, polvo de productos almacenados, insectos, hojas secas, entre otros (Bernhard *et al.*, 1997; Chaufaux *et al.*, 1997; Nester *et al.*, 2002). Bt produce proteínas insecticidas denominadas δ -endotoxinas durante la fase de esporulación como inclusiones parasporales que se pueden observar en la **figura 1**, los cristales pueden estar formados por una o más proteínas, llamadas Cry y Cyt (Höfte *et al.*, 1989; Helgason *et al.*, 2000).

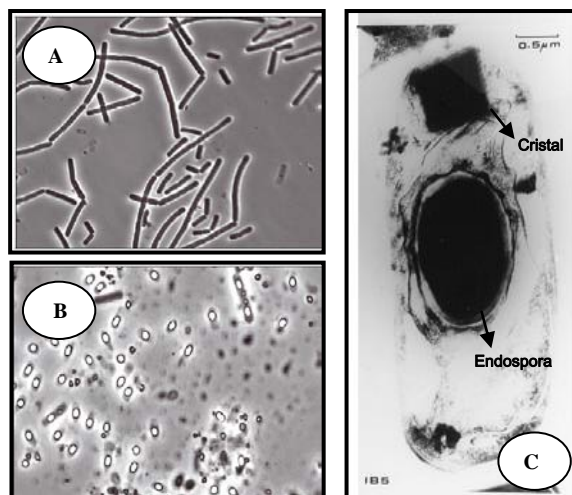


Figura 1. *Bacillus thuringiensis*. Microfotografía de (A) células vegetativas (1000X) (B) esporas (1000X) y (C) microfotografía en microscopio electrónico de transmisión (tomadas de: A y B Sanchis 2011, y C Bravo *et al.*, 1998).

El ciclo de vida de Bt se caracteriza por presentar dos fases, que incluyen: 1) división de las células vegetativas y 2) la formación de esporas. La célula vegetativa se divide asexualmente en dos células hijas uniformes por la formación de un septo de división a mitad de lo largo de la membrana plasmática. Cuando la célula se encuentra en condiciones carentes de nutrientes se activa el proceso denominado esporulación, que se esquematiza en la **figura 2**; consiste en la división celular asimétrica y se caracteriza por presentar siete etapas (Bulla *et al.*, 1980):

- Fase I: Formación de filamentos axiales.
- Fase II: Formación del septo de la pre-espora.
- Fase III: Primera aparición de cristales paraesporales y la formación de una pre-espora.
- Fase IV a VI: Formación del exosporio, pared celular primordial, transformación de la espora y nucleóide y maduración de esporas.
- Fase VII: Lisis de los esporangios.

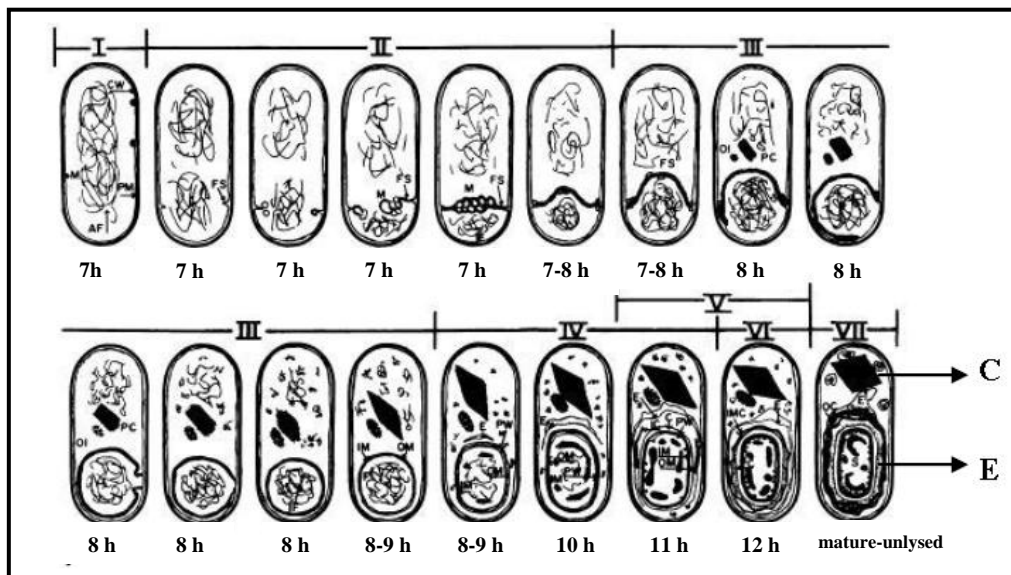


Figura 2. Fases del proceso de esporulación. Se indica la fase en número romano y en la parte inferior las horas, C y E indican cristal y espora respectivamente (modificada de Bulla *et al.*, 1980).

1.3 Regulación y expresión de genes *cry*

Una característica común de los genes *cry* es que se expresan durante la fase estacionaria del crecimiento y por lo general, las proteínas Cry se acumulan en la célula madre como

inclusiones cristalinas a partir de la fase III y hasta la fase VII de la esporulación (Schnepf *et al.*, 1998; Crickmore *et al.*, 1998).

Las proteínas Cry constituyen el 20-30% del peso seco de las células (Bulla *et al.*, 1980). La síntesis elevada de las proteínas Cry es un evento controlado de manera coordinada por una serie de mecanismos que ocurren a nivel transcripcional, postranscripcional y postraduccional. Los genes *cry* se clasifican como dependientes o independientes de la esporulación en base a sus mecanismos transcripcionales (Schnepf *et al.*, 1998). Por lo general, el proceso de esporulación de Bt está controlado por la activación sucesiva de factores sigma que unen a la RNA polimerasa (Moran, 1993).

En *B. thuringiensis* se han descrito cinco factores sigma de transcripción específicos: σ^H , σ^F , σ^E , σ^G y σ^K (**tabla 1**), que están fuertemente regulados en el tiempo y espacio; aparecen en un orden consecutivo durante la esporulación. El factor σ^H está activo en la célula antes de la división. Los factores σ^E y σ^K están activos en la célula madre, y σ^F y σ^G están activos en la pre-espora. Los factores σ^E y σ^F se expresan durante la fase de esporulación temprana y los factores σ^K y σ^G durante la esporulación tardía (Lereclus *et al.*, 2000).

Los genes *cry1* codifican para proteínas de aproximadamente 130 kDa que se agrupan en cristales bipiramidales. El mecanismo de transcripción es dependiente de la esporulación. Estos genes se expresan a través de dos promotores que se encuentran sobrelapados, denominados BtI y BtII. La transcripción del promotor río abajo BtI se activa entre las fases II y VI de la esporulación y emplea el factor σ^E . Posteriormente, la transcripción se produce por el promotor río arriba BtII, que se activa a partir de la etapa VI hasta el final de la esporulación y emplea el factor σ^K . El uso secuencial de los dos promotores asegura la síntesis de la protoxina en todo el ciclo de esporulación (Wong *et al.*, 1983).

Tabla 1. Factores de transcripción involucrados en la expresión de genes *cry*.

Gen	Factores sigma	Referencias
<i>cry1A</i>	$\sigma^E, \sigma^K, \sigma^H$	Wong <i>et al.</i> , 1993. Perez-Garcia <i>et al.</i> , 2010.
<i>cry2A</i>	σ^E	Winder <i>et al.</i> , 1989.
<i>cry3A</i>	σ^A	Sekar, V. 1988. Agaisse y Lereclus, 1994.
<i>cry4A</i>	$\sigma^E, \sigma^K, \sigma^H$	Poncet <i>et al.</i> , 1997.
<i>cry4B</i>	σ^E, σ^K	Poncet <i>et al.</i> , 1997.
<i>cry8Ea1</i>	σ^E, σ^H	Du <i>et al.</i> , 2012.
<i>cry11A</i>	$\sigma^E, \sigma^K, \sigma^H$	Dervyn <i>et al.</i> , 1995.
<i>cry18A</i>	σ^E, σ^K	Zhang <i>et al.</i> , 1998.

1.4 Toxinas Cry de 3 dominios

La familia de proteínas Cry de 3 dominios (Cry-3d) son moléculas globulares que contienen tres distintos dominios. El alineamiento de sus secuencias reveló la presencia de cinco bloques conservados que se pueden apreciar en la **figura 3** (Bravo *et al.*, 1997). Sin embargo, algunos bloques no están presentes en algunos miembros de la familia Cry-3d; una característica particular de los miembros de esta familia es la presencia de protoxinas con dos diferentes longitudes (130 kDa y 70 kDa). La extensión del extremo C-terminal que se encuentra en protoxinas de alto peso molecular es dispensable para la toxicidad y se propone que juega un papel importante en la formación de las inclusiones cristalinas dentro de la bacteria (de Maagd *et al.*, 2001).

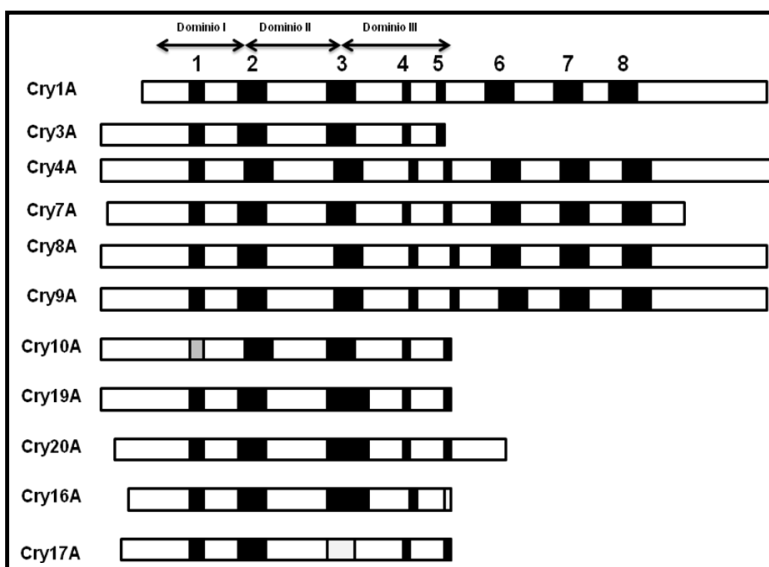


Figura 3. Bloques conservados entre proteínas Cry. En este esquema se representan los bloques que se encuentran conservados entre las proteínas Cry marcados del 1 al 5, los bloques negros, grises o blancos indican identidad alta, mediana o baja, respectivamente (modificada de Schnef *et al.*, 1998).

A la fecha se ha resuelto la estructura terciaria de ocho toxinas Cry mediante cristalografía de rayos X: Cry1Aa (Grochulski, *et al.*, 1995), Cry2Aa (Morse *et al.*, 2001), Cry3Aa (Li *et al.*, 1991), Cry3Bb1 (Galitsky *et al.*, 2001), Cry4Aa (Boonserm *et al.*, 2006), Cry4Ba (Boonserm *et al.*, 2005), Cry5B (Hui *et al.*, 2012) y Cry8Ea1 (Guo *et al.*, 2009). En la **figura 4** se muestra que su estructura confirma una organización conservada de tres dominios, a continuación se encuentra una breve descripción de cada uno de ellos:

- **Dominio I:** Está formado por siete α -hélices antiparalelas, las hélices α_1 , α_2 , α_3 , α_4 , α_6 y α_7 son de naturaleza anfipática y rodean a la hélice α_5 hidrofóbica central (Li *et al.*, 1991). Diversos análisis biofísicos y de mutagénesis sugieren que este dominio lleva a cabo cambios conformacionales cuando interacciona con la superficie de la membrana del insecto blanco, lo que permite su inserción y la formación del poro lítico (Masson *et al.*, 1999; Pardo *et al.*, 2006; Rausell *et al.*, 2004). Se ha reportado que la hélice α_3 está implicada en la oligomerización de la toxina (Vachon *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2007; Muñoz-Garay *et al.*, 2009) y se ha propuesto que las hélices α_4 y α_5 se insertan en la membrana y forman un poro lítico transmembranal (Masson *et al.*, 1999; Vachon *et al.*, 2004).
- **Dominio II:** Se compone de tres láminas- β plegadas antiparalelas empacadas rodeando un centro hidrofóbico formando un arreglo de prisma de estructuras- β y dos hélice α cortas (Li *et al.*, 1991). Es el dominio más variable dentro de la familia Cry-3d (de Maagd *et al.*, 2001). Las asas expuestas están involucradas en el reconocimiento de los receptores, por lo tanto se atribuye que este dominio está relacionado con la especificidad en el reconocimiento de los receptores (Rajamohan *et al.*, 1998).
- **Dominio III:** Consiste de dos láminas- β antiparalelas formando una estructura de β -sándwich (Li *et al.*, 1991); este dominio también participa en la especificidad de la toxina ya que intercambios del dominio III resultaron en cambios de especificidad (de Maagd *et al.*, 2001). Se ha propuesto que el dominio II junto con el III son responsables de la estabilidad estructural e interacción con los receptores (Lee *et al.*, 1995; Jenkins *et al.*, 1999).

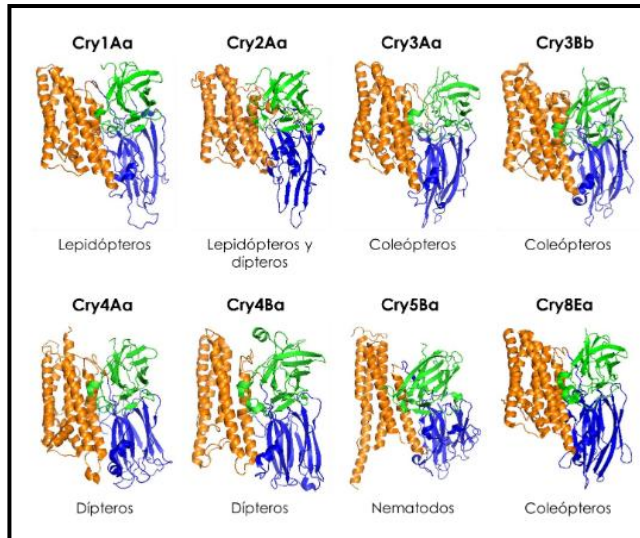


Figura 4. Comparación de la estructura terciaria de las toxinas Cry-3d. En color anaranjado se indica el dominio I, en azul el dominio II y en verde el dominio III. En la parte inferior de cada representación se encuentra el orden de insectos blanco de cada toxina. Cry1Aa (PDB: 1CIY), Cry2Aa (PDB: 1I5P), Cry3Aa (PDB: 1DLC), Cry3Bb1 (PDB: 1JI6), Cry4Aa (PDB: 2C9K), Cry4Ba (PDB: 1W99), Cry5B (PDB: 4D8M) y Cry8Ea1 (PDB: 3EB7) (tomado de Gaytán, 2013).

1.5 Mecanismo de acción de las toxinas Cry de 3 dominios

El mecanismo de acción de las toxinas Cry se ha estudiado intensivamente, actualmente se proponen dos modelos para entender cómo es que estas toxinas actúan en el intestino medio de los insectos (Bravo *et al.*, 2007).

- **Modelo de formación de poro:** La unión secuencial de la toxina con receptores presentes en el intestino medio permite que se conduzcan cambios conformacionales que conllevan a la oligomerización; esta estructura es capaz de insertarse en la membrana y formar un poro lítico que provoca un desbalance osmótico promoviendo la muerte celular (Pacheco *et al.*, 2009). En la **figura 5** se encuentra una representación a detalle de este modelo.

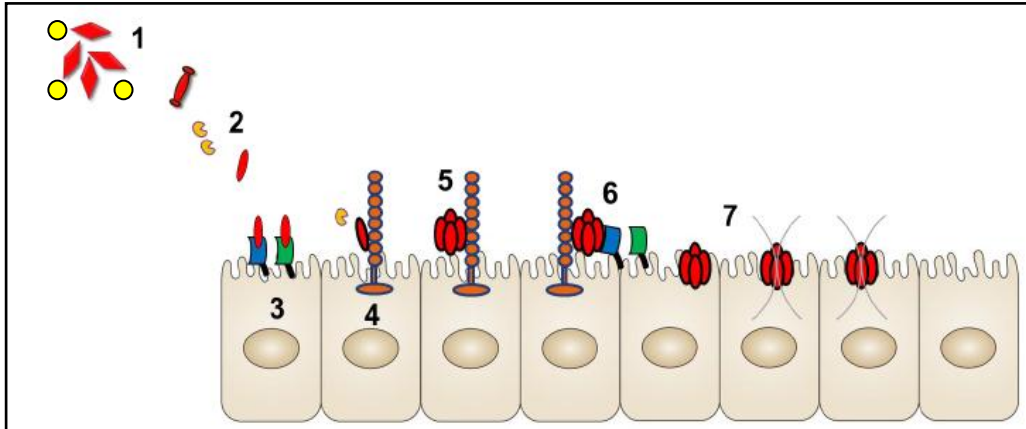


Figura 5. Modelo de formación de poro de la toxina Cry1Ab en *M. sexta*. Se muestran los pasos secuenciales en el mecanismo de acción. **1)** Una larva susceptible ingiere la solución espора- cristal, **2)** los cristales se solubilizan por el pH alcalino y se libera la protoxina (en color rojo) que es activada a un monómero (en color rojo) por proteasas (en color anaranjado), **3)** la toxina en su forma activa se une a los receptores anclados por glicosilfosfatidil inositol (GPI) ALP (Kd= 267.3 nM) (en color azul) y APN (Kd= 101.6 nM) (en color verde) lo que permite la localización de la toxina en la membrana, **4)** se favorece la interacción de la toxina con el receptor tipo caderina (en color anaranjado) con mayor afinidad (Kd=1mM), **5)** esta interacción induce la exposición de una región hidrofóbica que es escindida por proteasas resultando en la oligomerización de la toxina (en color rojo), **6)** posteriormente el oligómero se une nuevamente a los receptores APN (Kd= 0.52 nM) y ALP (Kd=0.6 nM) y finalmente **7)** el oligómero se inserta en la membrana formando poros que resultan en la lisis celular (modificada de Gaytán, 2013).

- **Modelo de inducción de señalización intracelular:** este modelo se propuso con base en un estudio realizado en la línea celular H5 de *Trichoplusia ni* proveniente de ovario, la cual fue transfectada con el gen de *caderina* de *M. sexta*. La unión de Cry1Ab monomérica a la caderina, activa una cascada de señalización dependiente de Mg^{2+} que involucra la estimulación de una proteína G mediante la hidrólisis de ATP y la adenilato ciclasa para incrementar los niveles intracelulares de AMPc, resultando en la activación de la proteína quinasa A (PKA), que a su vez conduce a la muerte celular por necrosis (Zhang *et al.*, 2006).

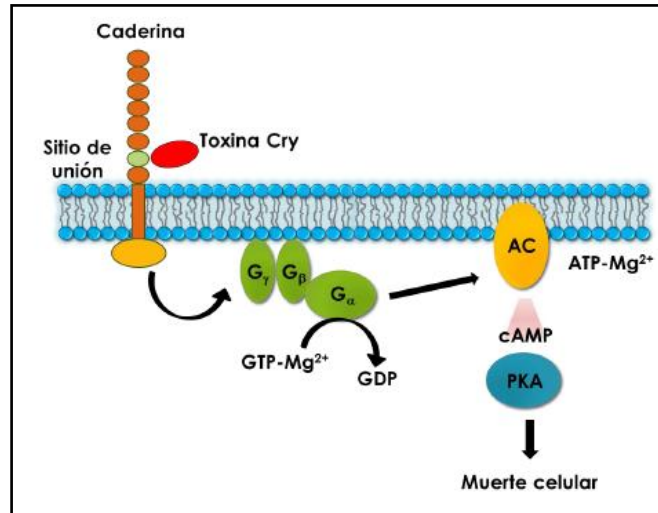


Figura 6. Modelo de inducción de señalización intracelular. La interacción de la toxina con la caderina activa a una proteína G que incrementa la actividad de adenil ciclasa (AC), resultando en un aumento en los niveles de AMPc que a su vez activa la proteínquinasa A (PKA), que es responsable de la activación de un mecanismo intracelular que resulta en la muerte celular (tomada de Gaytán, 2013).

1.6 Mecanismos de resistencia en insectos

La resistencia se define como “el decremento en la susceptibilidad (basado en cambios genéticos) a un pesticida en una población provocada por la exposición del pesticida en el campo” (Tabashnik *et al.*, 2014). El mecanismo de resistencia que se observa con mayor frecuencia involucra defectos en la unión con el receptor caderina, también se ha reportado la resistencia debido a defectos en la producción de proteasas en el intestino de la larva o a una respuesta inmune elevada (**figura 7**) (Griffits y Aroian, 2005; Ferre y van Rie, 2002; Gunning *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2004).

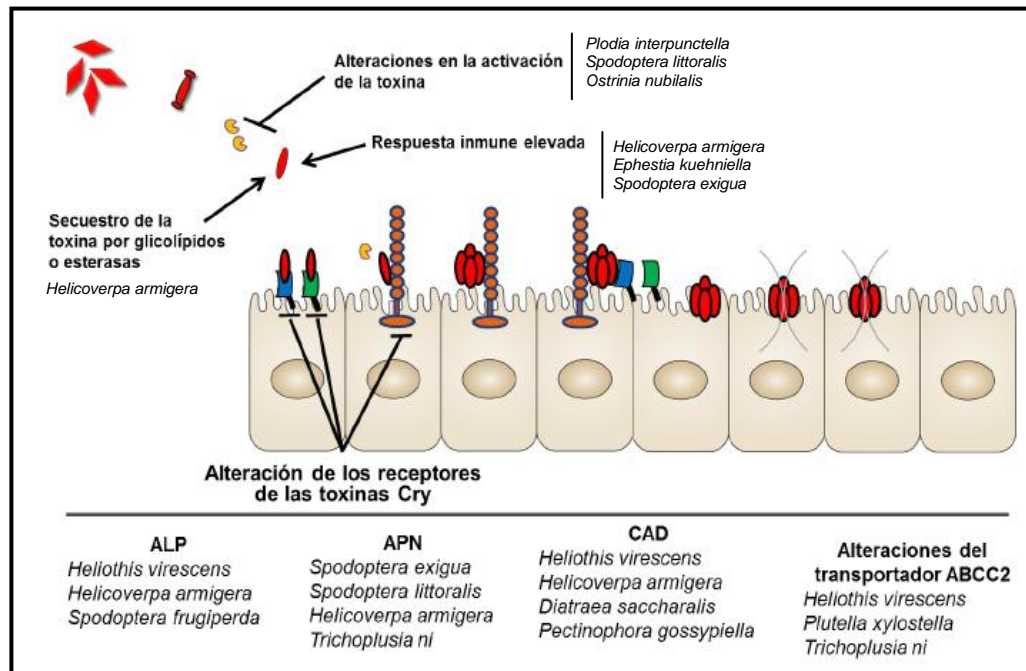


Figura 7. Mecanismos de resistencia a toxinas Cry. Se enuncia el tipo de resistencia y las especies en las cuales se han encontrado (modificada de Bravo *et al.*, 2010).

En el año de 1996 en Estados Unidos se comercializó por primera vez la tecnología de cultivos-Bt (Kleter *et al.*, 2007; Qaim y Zilberman, 2003). A partir de esa fecha se han cultivado más de 570 millones de hectáreas en todo el mundo, principalmente maíz y algodón, que producen las proteínas Cry insecticidas de la bacteria Bt (James, 2013; Tabashnik *et al.*, 2013) y esto ha generado una presión de selección intensiva en poblaciones de insectos-plaga (Gassman *et al.*, 2014). En años recientes se ha reportado la presencia de poblaciones de insectos resistentes a toxinas Cry en campos de cultivos-Bt; la **tabla 2** enlista las especies de insectos resistentes y el cultivo-Bt descritas hasta el momento.

Tabla 2. Especies de insectos-plaga resistentes aislados en campo.

Insecto-plaga	País	Cultivo GM	Referencia
<i>Helicoverpa zea</i>	Estados Unidos	Algodón-Bt que expresa la toxina Cry1Ac	Luttrell y Alli, 2007; Tabashnik <i>et al.</i> , 2008.
<i>Helicoverpa zea</i>	Estados Unidos	Algodón-Bt que expresa la toxina Cry2Ab	Ali y Luttrell 2007; Tabashnik <i>et al.</i> 2009, 2013
<i>Helicoverpa armigera</i>	China	Algodón-Bt que expresa la toxina Cry1Ac	Zhang <i>et al.</i> , 2011, 2012a; Jin <i>et al.</i> 2010.
<i>Pectinophora gossypiella</i>	India, China	Algodón-Bt que expresa la toxina Cry1Ac	Tabashnik <i>et al.</i> , 2009. Dhurua y Gujar, 2012; Wan <i>et al.</i> , 2012.
<i>Spodoptera furgiperda</i>	Puerto Rico, Brasil	Maíz-Bt que expresa la toxina Cry1F	Storer <i>et al.</i> , 2010, 2012; Farias <i>et al.</i> , 2014.
<i>Busseola fusca</i>	Sudáfrica	Maíz-Bt que expresa la toxina Cry1Ab	Van Rensburg 2007; Kruger <i>et al.</i> , 2011.
<i>Helicoverpa punctigera</i>	Australia	Algodón-Bt que expresa la toxina Cry2Ab	Downes <i>et al.</i> , 2010.
<i>Helicoverpa armigera</i>	Australia	Algodón-Bt que expresa la toxina Cry2Ab	Downes <i>et al.</i> , 2012.
<i>Helicoverpa armigera</i>	Australia	Algodón-Bt que expresa la toxina Cry1Ac	Downes y Mahon 2012, Tabashnik <i>et al.</i> 2013
<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	Estados Unidos	Maíz-Bt que expresa la toxina Cry3Bb1	Gassman <i>et al.</i> , 2011.
<i>Diatraea saccharalis</i>	Estados Unidos	Maíz-Bt que expresa la toxina Cry1Ab	Huang <i>et al.</i> , 2012; Zhang <i>et al.</i> , 2013.

Además de los insectos resistentes encontrados en el campo, se ha encontrado una población de *Plutella xylostella* que desarrolló la resistencia a las aplicaciones de aerosol con la cepa HDI de Bt que contiene las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry2A (Tabashnik *et al.*, 2003). En el análisis del mecanismo de resistencia en esta cepa de *P. xylostella* se ha encontrado que no se relaciona con mutaciones en el gen de *caderina* (Baxter *et al.*, 2005), ni con ningún otro gen que codifica para las moléculas de receptores putativos que han sido descritos en otros insectos a la fecha, como la aminopeptidasa-N, fosfatasa alcalina ni glucolípidos (Baxter *et al.*, 2008). Recientemente se demostró que la mutación que presenta esta cepa de *P. xylostella* está ligada al transportador ABC-C2 (Gahan *et al.*, 2010); la expresión de este transportador también se encuentra afectada en otros insectos resistentes a toxinas Cry como *Bombyx mori* y *Trichoplusia ni* (Atsumi *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012b). Sin embargo, la participación de esta proteína en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1A no se ha descrito con precisión, se ha propuesto que podría ser una molécula de unión (Tanaka *et al.*, 2013).

1.7 Estrategias para contender con la resistencia de insectos

A pesar que los cultivos-Bt han ayudado para suprimir plagas de insectos, promoviendo el control biológico y reduciendo el uso de insecticidas químicos, la evolución de la resistencia a toxinas-Bt puede disminuir estos beneficios. Es por esto que se han desarrollado diversas estrategias para contender con la resistencia. A continuación se describen:

- **Estrategia de dosis altas/refugios**

Existen tres requerimientos fundamentales en los refugios: a) los cultivos-Bt deben expresar dosis altas de toxina, b) la frecuencia inicial de los alelos resistentes debe ser baja y, c) se necesita que el refugio esté cerca, entendiéndose como refugio a una zona cercana al cultivo-Bt en donde se siembran plantas silvestres, es decir, plantas que no expresan genes *cry* y que permiten que sobrevivan todos los insectos susceptibles (Andow y Hutchison 1998; US EPA 2001).

El éxito en esta estrategia se vería reflejado en el retraso de la evolución de resistencia, si los insectos homocigotos resistentes (RR) se cruzan con homocigotos susceptibles (SS) y su descendencia heterocigota (RS) que es susceptible a la toxina se elimina por la alta concentración de toxina que expresa el cultivo-Bt (Andow y Hutchison 1998). Es importante destacar que la correcta aplicación de esta estrategia requiere de un compromiso por parte del gobierno, trabajadores del campo, industrias biotecnológicas y científicos (Huang *et al.*, 2011).

- **Apilamiento de genes *cry***

El concepto de apilamiento se aplica cuando dos o más toxinas con diferentes mecanismos de acción, por ejemplo, que se unan a diferentes moléculas receptoras, se producen en la misma planta-Bt. En este caso, la posibilidad de generar insectos resistentes disminuye exponencialmente porque se requerirían múltiples mutaciones para perder la susceptibilidad de todas las toxinas (Bravo y Soberón, 2008). En el año 2003, se produjeron las primeras plantas transgénicas de algodón que expresaban dos toxinas: Cry1Ac y Cry2Ab. Estas plantas-Bt han demostrado ser muy eficaces contra las plagas de lepidópteros y se sabe que estas dos proteínas Cry se unen a receptores diferentes (Chitkowski *et al.*, 2003).

Aunque el apilamiento de genes *cry* es una forma eficaz de retrasar la resistencia en insectos, se ha demostrado que esta propuesta pierde su eficacia cuando las plantas transgénicas que expresan sólo un gen *cry*, por ejemplo *cry1Ac*, crecen en las proximidades de cultivos-Bt que expresan dos genes *cry*, porque en este caso se

seleccionaron los insectos resistentes a ambos tipos de plantas Bt (Zhao *et al.*, 2005). Por lo tanto, es crucial que los cultivos-Bt que presentan apilamiento de genes *cry* se planten de manera aislada de otras plantas-Bt. Por último, la eficacia de esta estrategia depende totalmente en la posibilidad de tener dos toxinas que maten al mismo insecto pero que se unan a receptores diferentes y esto no siempre se cumple para la mayoría de las plagas (Bravo y Soberón, 2008).

- **Toxinas Cry1AMod**

En el año 2007 se diseñaron y construyeron mediante ingeniería genética las toxinas modificadas Cry1AbMod y Cry1AcMod, que carecen de la hélice $\alpha 1$ y la mitad de la hélice $\alpha 2a$; son capaces de formar oligómeros en ausencia de caderina (Soberón *et al.*, 2007). Su eficacia se evaluó en dos experimentos: a) mediante el silenciamiento del receptor caderina en larvas de *M. sexta* que resultaron ser altamente tolerantes a Cry1Ab y no así a la toxina Cry1AbMod y b) las toxinas modificadas también fueron capaces de matar a *P. gossypiella* resistentes, en las cuales se encontró que la resistencia a Cry1A se debe a deleciones en el gen de la *caderina* (Soberón *et al.*, 2007).

Se demostró que las toxinas Cry1AMod no requieren la interacción con el receptor de la caderina y matan células de insectos mediante la interacción con el segundo receptor APN, ya que son capaces de oligomerizar y formar poros líticos (Bravo y Soberón, 2008). Adicionalmente, se ha demostrado que son capaces de matar otras poblaciones de insectos resistentes como *T. ni* y *P. xylostella*. Estos datos indican que las toxinas Cry1AMod constituyen una herramienta muy eficaz para el control de insectos resistentes.

2. ANTECEDENTES

2.1 Mecanismo de acción de las toxinas Cry1AMod

A diferencia del mecanismo de acción de las toxinas Cry1A silvestres, las toxinas modificadas Cry1AMod no requieren de la unión de la toxina al receptor caderina y del corte proteolítico adicional en el extremo N-terminal que facilita la oligomerización (Soberón *et al.*, 2007; Muñoz-Garay *et al.*, 2009). La unión de la toxina con el receptor caderina y el corte proteolítico adicional en el extremo N-terminal son requeridos para facilitar la formación de un pre-poro con estructura oligomérica por las toxinas Cry-3d silvestres, el pre-poro oligomérico es importante para la inserción en la membrana y la toxicidad (Gómez *et al.*, 2002b; Rausell *et al.*, 2004).

Las proteínas Cry1AbMod y Cry1AcMod inducen la formación *in vitro* del pre-poro oligomérico sin requerir de la unión al receptor caderina, ni de fragmentos de la proteína de caderina conteniendo los sitios de unión de la toxina Cry o del anticuerpo en formato scFv (scFv73), el cual mimetiza a la región de unión a la toxina Cry presente en el receptor caderina (Gómez *et al.*, 2002b). En contraste, las proteínas Cry1A silvestres requieren de la presencia del anticuerpo scFv73 o de fragmentos de la proteína caderina o de la caderina para producir el pre-poro oligomérico *in vitro* (Soberón *et al.*, 2007).

Para demostrar que las toxinas Cry1AMod son capaces de formar estructuras oligoméricas de pre-poro, las protoxinas de Cry1AbMod y Cry1AcMod, fueron tratadas sólo con la proteasa tripsina, produciendo así los oligómeros de 250 kDa. En contraste, al hacer el mismo tratamiento con tripsina a las protoxinas de las toxinas silvestres, Cry1Ab y Cry1Ac, sólo se observa la estructura del monómero de 60 kDa (**figura 8**) (Soberón *et al.*, 2007).

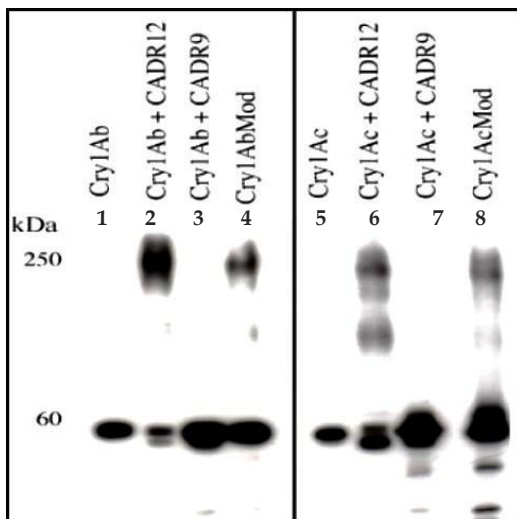


Figura 8. Formaciones de oligómero por toxinas Bt nativas y modificadas. Se añadieron fragmentos de caderina correspondientes a las regiones de unión con la toxina (CADR12, carriles 2 y 6) y regiones que no se unen a la toxina (CADR9, carriles 3 y 7). En Western blot se probó con anticuerpos policlonales a Cry1Ab (carriles 1 a 4) o a Cry1Ac (carriles 5 a 8) (modificada de Soberón *et al.*, 2007).

2.2 Toxicidad de Cry1AMod

La toxicidad ha sido determinada en bioensayos alimentando a larvas de insectos susceptibles y resistentes con dietas que contienen diferentes concentraciones de las toxinas Cry1AMod. Se ha demostrado que las toxinas Cry1AMod son eficaces abatiendo insectos plaga que se han convertido en resistentes; sin embargo, se ha demostrado que presentan una pérdida en la potencia de estas toxinas contra insectos susceptibles (Soberón *et al.*, 2007; Tabashnik *et al.*, 2011). A continuación se describen algunos ejemplos:

- 1) *P. xylostella* (nombre común: palomilla dorso de diamante): Es el primer insecto que desarrolló resistencia a las toxinas Bt en el campo (Ferre y van Rie, 2002). No presenta mutaciones en el gen de *caderina*, sino en el transportador ABC-C2 (Gahan *et al.*, 2010). En la **figura 9.A** se retó con la toxina Cry1Ac silvestre a la línea susceptible PxGen88 y a la línea resistente rPxAcR; se encontró que la relación de resistencia fue de >100,000 para la toxina Cry1Ac silvestre. En la **figura 9.B** se retó con la toxina Cry1AcMod, tanto a la línea susceptible como a la resistente, encontrando que la relación de resistencia fue de 10; con la toxina Cry1AcMod se redujo notablemente la resistencia. Sin embargo, cuando se compara la toxicidad de la Cry1AcMod en la línea susceptible (línea en color morada) notamos que es aproximadamente 10 veces menos tóxica que la toxina Cry1Ac silvestre.

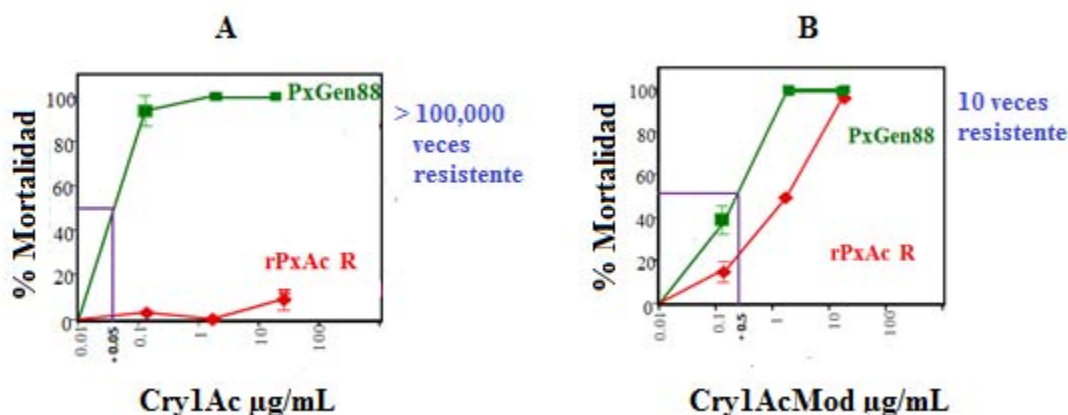


Figura 9. Gráficas del bioensayo retando con las toxinas Cry1Ac silvestre y Cry1AcMod a larvas de *P. xylostella*. **A**) Se reta con la toxina Cry1Ac silvestre a la línea susceptible PxGen88 (en color verde) y a la línea resistente rPxAcR (en color rojo), la relación de resistencia es de >100,000. **B**) Se reta con la toxina Cry1AcMod a la línea susceptible PxGen88 (en color verde) y a la línea resistente rPxAcR (en color rojo), la relación de resistencia es de 10. La línea en color morado indica la LC₅₀ de la toxina Cry1AcMod aproximada en ambos tratamientos. Comunicación personal de la Dra. Alejandra Bravo.

- 2) ***T. ni*** (nombre común: gusano medidor de la col): Fue el segundo insecto resistente que se encontró en invernaderos asperjados con toxinas Bt (Franklin *et al.*, 2009). La línea resistente rTn GLEN presenta una reducción en la expresión del receptor APN (Wang 2010). En la **figura 10.A** se retó con la toxina Cry1Ac silvestre a la línea susceptible TnS y la línea resistente rTn GLEN; se encontró que la relación de resistencia fue de >2,000 para la toxina Cry1Ac silvestre. En la **figura 10.B** se retó con la toxina Cry1AcMod, tanto a la línea susceptible como resistente, encontrando que la relación de resistencia fue de 9; con la toxina Cry1AcMod se redujo notablemente la resistencia. Sin embargo, cuando se compara la toxicidad de la Cry1AcMod en la línea susceptible (línea en color morado) notamos que es 10 veces menos tóxica que la toxina Cry1Ac silvestre.

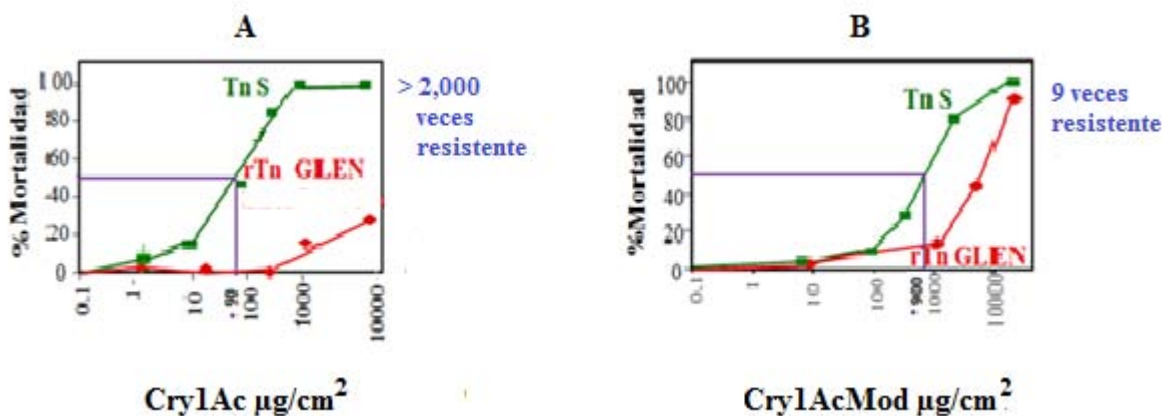


Figura 10. Gráficas del bioensayo retando con las toxinas Cry1Ac silvestre y Cry1AcMod a larvas de *T. ni*. **A)** Se reta con la toxina Cry1Ac silvestre a la línea susceptible TnS (en color verde) y a la línea resistente rTn GLEN (en color rojo), la relación de resistencia es de >2,000. **B)** Se reta con la toxina Cry1AcMod a la línea susceptible TnS (en color verde) y a la línea resistente rTn GLEN (en color rojo), la relación de resistencia es de 9. La línea en color morado indica la LC₅₀ de la toxina Cry1AcMod aproximada en ambos tratamientos. Comunicación personal de la Dra. Alejandra Bravo.

- 3) ***P. gossypiella*** (nombre común: gusano rosado): La resistencia de la línea AZP-R se detectó en 1997 mediante la recopilación de individuos de 10 campos de algodón distintos en Arizona. Se identificaron tres alelos mutantes en el gen de *caderina* relacionados a la resistencia (Morin *et al.*, 2003). En la **figura 11.A** se retó con la toxina Cry1Ac silvestre a la línea susceptible APHI-S y la línea resistente AZP-R. Se encontró que la relación de resistencia fue de 3,700 para la toxina Cry1Ac silvestre. En la **figura 11.B** se retó con la toxina Cry1AcMod, tanto a la línea susceptible como resistente, encontrando que la relación de resistencia fue de cero; con la toxina Cry1AcMod se abatió por completo la resistencia. Sin embargo, cuando se

compara la toxicidad de la Cry1AcMod en la línea susceptible (línea en color verde) notamos que es 25 veces menos tóxica que la toxina Cry1Ac silvestre.

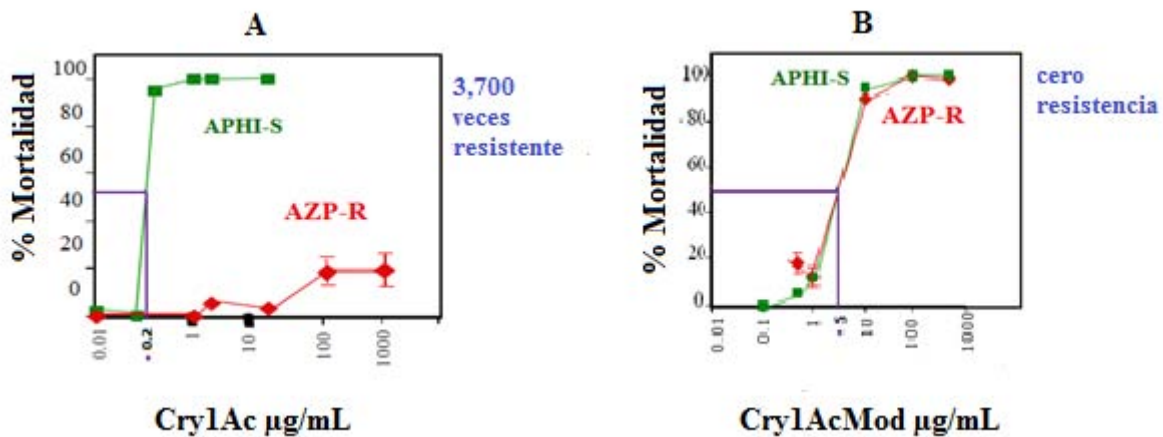


Figura 11. Gráficas del bioensayo retando con las toxinas Cry1Ac silvestre y Cry1AcMod a larvas de *P. gossypiella*. Se reta con la toxina Cry1Ac silvestre a la línea susceptible APhi-S (en color verde) y a la línea resistente AZP-R (en color rojo), la relación de resistencia es de 3,700. B) Se reta con la toxina Cry1AcMod a la línea susceptible APhi-S (en color verde) y a la línea resistente AZP-R (en color rojo), la relación de resistencia es de cero. La línea en color morado indica la LC₅₀ de la toxina Cry1AcMod aproximada en ambos tratamientos. Comunicación personal de la Dra. Alejandra Bravo.

Estos resultados son muy interesantes ya que indican que las toxinas Cry1AcMod son muy eficientes para matar insectos que son resistentes y que además presentan diferentes mecanismos de resistencia. Sin embargo, se puede apreciar que estas toxinas no son tan efectivas respecto a las toxinas silvestres hacia insectos susceptibles, por lo tanto resulta esencial optimizar las toxinas Cry1AcMod para una posible aplicación biotecnológica.

2.3 Procesamiento del extremo N-terminal

El procesamiento proteolítico del extremo N-terminal es esencial en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1Ac (Bravo *et al.*, 2002). En un trabajo previo en el laboratorio, se realizó el procesamiento proteolítico de la toxina Cry1Ab con el jugo gástrico de *M. sexta*, como resultado se obtuvieron dos fragmentos de 60 y 58 kDa. La secuencia del N-terminal del primer fragmento indica que su formación fue resultado de un corte anterior a los residuos L57 y G58, localizados en el interior de la hélice α 2a, el segundo fragmento inicia en los residuos F67 y G68 localizados entre las hélices α 2a y α 2b. El fragmento de 60 kDa presentó la mayor actividad de formación de poro *in vitro* (Miranda *et al.*, 2001).

En el año 2000 se analizó el papel de la proteólisis de la toxina Cry1Ac con el jugo gástrico de dos especies de insectos: *Pieris brassicae* y *Mamestra brassicae*. Mediante secuenciación del N-terminal se determinaron los sitios de corte en la toxina Cry1Ac al tratamiento de ambos jugos gástricos (**tabla 3**). Cabe mencionar que no se realizaron bioensayos u otro análisis para determinar la toxicidad de cada fragmento.

Tabla 3. Análisis del procesamiento proteolítico de la toxina Cry1Ac con el jugo gástrico de los insectos *Pieris brassicae* y *Mamestra brassicae* (modificado de Lightwood *et al.*, 2000).

Insecto	Secuencia del N-terminal	Posición del sitio de corte en Cry1Ac	Masa molecular (kDa)
<i>M. brassicae</i>	²⁹ IETGY	Antes de $\alpha 1$	60
<i>M. brassicae</i>	³⁴ TPIDI	Antes de $\alpha 1$	60
<i>M. brassicae</i>	⁵¹ VPGAG	Entre $\alpha 1$ y $\alpha 2a$	58
<i>M. brassicae</i>	⁵⁷ VLGVL	En $\alpha 2a$	40
<i>M. brassicae</i>	⁶⁷ IFGPS	Entre $\alpha 2a$ y $\alpha 2b$	40
<i>M. brassicae</i>	⁶⁹ GPSQW	Entre $\alpha 2a$ y $\alpha 2b$	40
<i>P. brassicae</i>	²⁹ IETGY	Antes de $\alpha 1$	60
<i>P. brassicae</i>	⁵⁴ AGFVL	En $\alpha 2a$	56
<i>P. brassicae</i>	⁶¹ VDIIW	En $\alpha 2a$	56
<i>P. brassicae</i>	⁶⁹ GPSQW	Entre $\alpha 2a$ y $\alpha 2b$	56

En el año 2002, se analizó el procesamiento proteolítico de la toxina Cry1Ab. Se observó que la incubación de esta toxina con un anticuerpo denominado scFv73 (que mimetiza al receptor tipo caderina) y el tratamiento con el jugo gástrico de *M. sexta* o la proteasa tripsina, resultaron en la formación de una estructura oligomérica que mostró actividad formadora de poro. Se determinó la secuencia del N-terminal y se encontró que carecía de la hélice $\alpha 1$ del dominio I (Gómez *et al.*, 2002b).

Como un dato adicional, se tiene la resolución de las estructuras cristalográficas de las toxinas Cry4Ba (Boonserm *et al.*, 2005) y Cry5B (Hui *et al.*, 2012). Durante la cristalización, la protoxina Cry4Ba se activó con la proteasa quimotripsina, resultando en la eliminación de las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2b$, la proteína activada adoptó una forma trimérica. Por otra parte, la protoxina Cry5B se activó con la proteasa elastasa, la secuenciación del N-terminal comenzando en el aminoácido D113. Lo anterior permite suponer que las primeras hélices no son esenciales para la actividad insecticida, sin embargo, si pueden influenciar un arreglo conformacional que favorezca la oligomerización. Por lo tanto, resulta interesante el hecho generar diferentes construcciones Cry1AMod, que se diferencien en el extremo N-terminal y determinar su toxicidad.

2.4 Expresión de genes *cry* bajo diferentes promotores

Se fusionó el gen de *cry1Ac* y un fragmento de *caderina* del insecto *Helicoverpa armigera* denominado “*hacad1*” bajo la regulación del promotor *cry3A*. Se analizó la expresión de ambas proteínas mediante SDS-PAGE (**figura 12**), asimismo se determinó la actividad de la toxina Cry1Ac y el fragmento de caderina mediante bioensayos en *H. armigera* y *Spodoptera exigua*, encontrando que aumentó de 5.1 y 6.5 veces respectivamente en contraste con la cepa que sólo expresa la proteína Cry1Ac (Peng *et al.*, 2010).

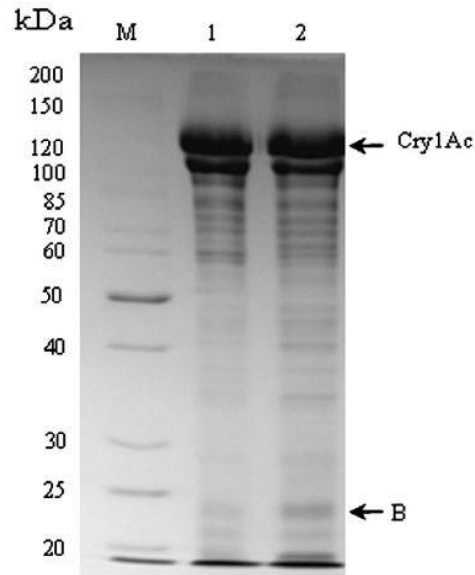


Figura 12. SDS-PAGE al 12% que muestra la co-expresión de HaCa1 y la toxina Cry1Ac en dos cultivos distintos. Carriles: M) Marcador de peso molecular, 1) Extracto del cultivo BMB701 de 36 horas y 2) Extracto del cultivo BMB1073 de 36 horas. La leyenda Cry1Ac indica la toxina y B el fragmento de caderina (tomada de Peng *et al.*, 2010).

En otro estudio, se analizó la expresión del gen *cry1Ac* bajo la regulación de los promotores *cry3A* y *cry1Ac*. Se encontró una mayor expresión del gen *cry1Ac* bajo la regulación del promotor *cry3A* (**figura 13**), ambas construcciones de Cry1Ac forman cristales bipiramidales y se analizó su actividad mediante bioensayos, ambas resultaron ser tóxicas contra el lepidóptero *Dendrolimus punctatus* (Chaoyin *et al.*, 2007).

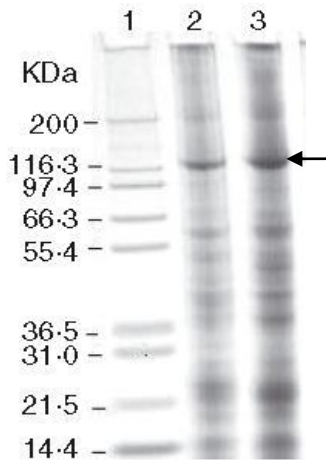


Figura 13. SDS-PAGE del contenido de endotoxina en las cepas transformantes BMB171 FBK y BMB171 F31. Carriles: 1) Marcador de peso molecular, 2) Cepa BMB171 FBK produciendo Cry1Ac (133 kDa) y 3) Cepa BMB171 F31 produciendo la toxina Cry1Ac. La flecha indica la toxina Cry1Ac (tomada de Chaoyin *et al.*, 2007).

Recientemente se llevó a cabo un estudio comparativo de la expresión del gen *cry1Ac* bajo la regulación de los promotores *cry1A*, *cry3A*, *cry4A* y *cry8E*. El promotor *cry8E* mostró la más alta actividad transcripcional. Adicionalmente, se analizó la expresión del gen *cry1Ac* mediante SDS-PAGE, encontrando que es mayor bajo la regulación del promotor *cry8E* comparado con el promotor *cry3A* (**figura 14**) (Zhou *et al.*, 2014).

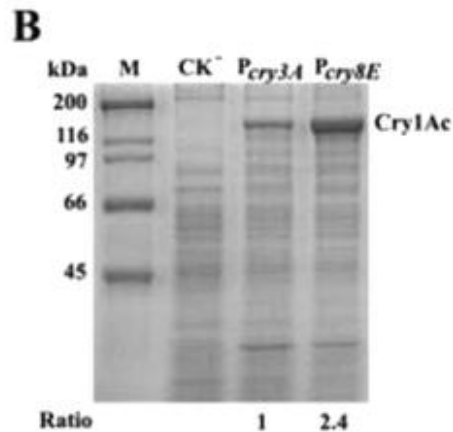


Figura 14. SDS-PAGE de la expresión de Cry1Ac en las cepas HD3A-1Ac y HD8E-1Ac. CK⁻ indica la cepa acristalífera (tomada de Zhou *et al.*, 2014).

Se han expresados genes *cry* bajo la regulación del promotor T7 en *E. coli*. Un ejemplo de ellos fue la expresión el gen *cry1ab17* en *E. coli* BL21 (**figura 15**) y se demostró la toxicidad de esta proteína mediante un bioensayo contra larvas de 3er instar de *Plutella xylostella* (Huang *et al.*, 2004).

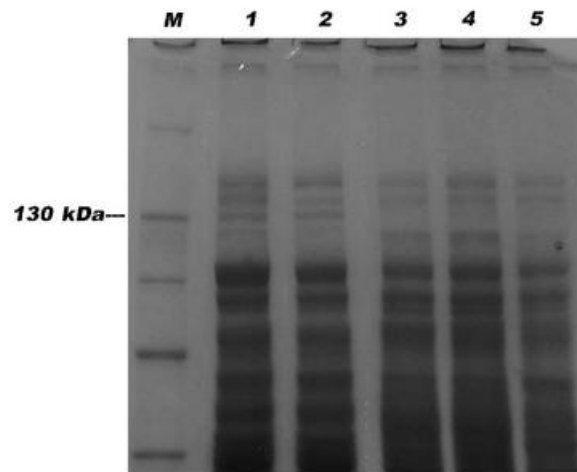


Figura 15. SDS-PAGE de la expresión de Cry1Ab17 producida en *E. coli* BL-21. Carriles: M) Marcador de peso molecular, 1) *E. coli* BL21/pET-29a-*cry1Ab17* después de 6 horas de inducción con IPTG, 2) *E. coli* BL21/pET-29a-*cry1Ab17* después de 4 horas de inducción con IPTG, 3) *E. coli* BL21/pET-29a-*cry1Ab17* sin inducción, 4) *E. coli* BL21/pET-29a-*cry1Ab17* después de 6 horas de inducción con IPTG y 5) Contenido total de proteínas de *E. coli* BL21 (tomada de Huang *et al.*, 2004).

3. JUSTIFICACIÓN

Con base en los reportes anteriormente descritos, se requiere generar de manera rápida y eficiente variantes de toxinas Cry1AMod para obtener una proteína altamente tóxica contra insectos susceptibles y resistentes; de esta manera se puede optimizar la tecnología de toxinas Cry1AMod obteniendo una aplicación biotecnológica a gran escala.

4. HIPÓTESIS

Existe una estrategia óptima para clonar y expresar variantes de la toxina Cry1AMod, que permita producir toxinas activas que presenten una toxicidad similar en insectos lepidópteros susceptibles y resistentes.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Determinar una estrategia que permita la correcta clonación y expresión de variantes Cry1AMod.

5.2 Objetivos particulares:

- a) Construir el vector de clonación para la selección adecuada y expresión de las variantes Cry1Ac modificadas.
- b) Diseñar siete variantes de la toxina Cry1Ac con diferentes deleciones en el extremo N-terminal.
- c) Expresar cada construcción en las cepas de *E. coli* DH5 α , C41 (DE3) y C43 (DE3).
- d) Clonar las variantes Mod bajo la regulación de los promotores *Pcry3A* y *PesxY* en Bt.
- e) Clonar y expresar directamente cada variante Mod bajo la regulación de promotor P1P2 en células acristalíferas de *B. thuringiensis* 407 cry $\bar{}$.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

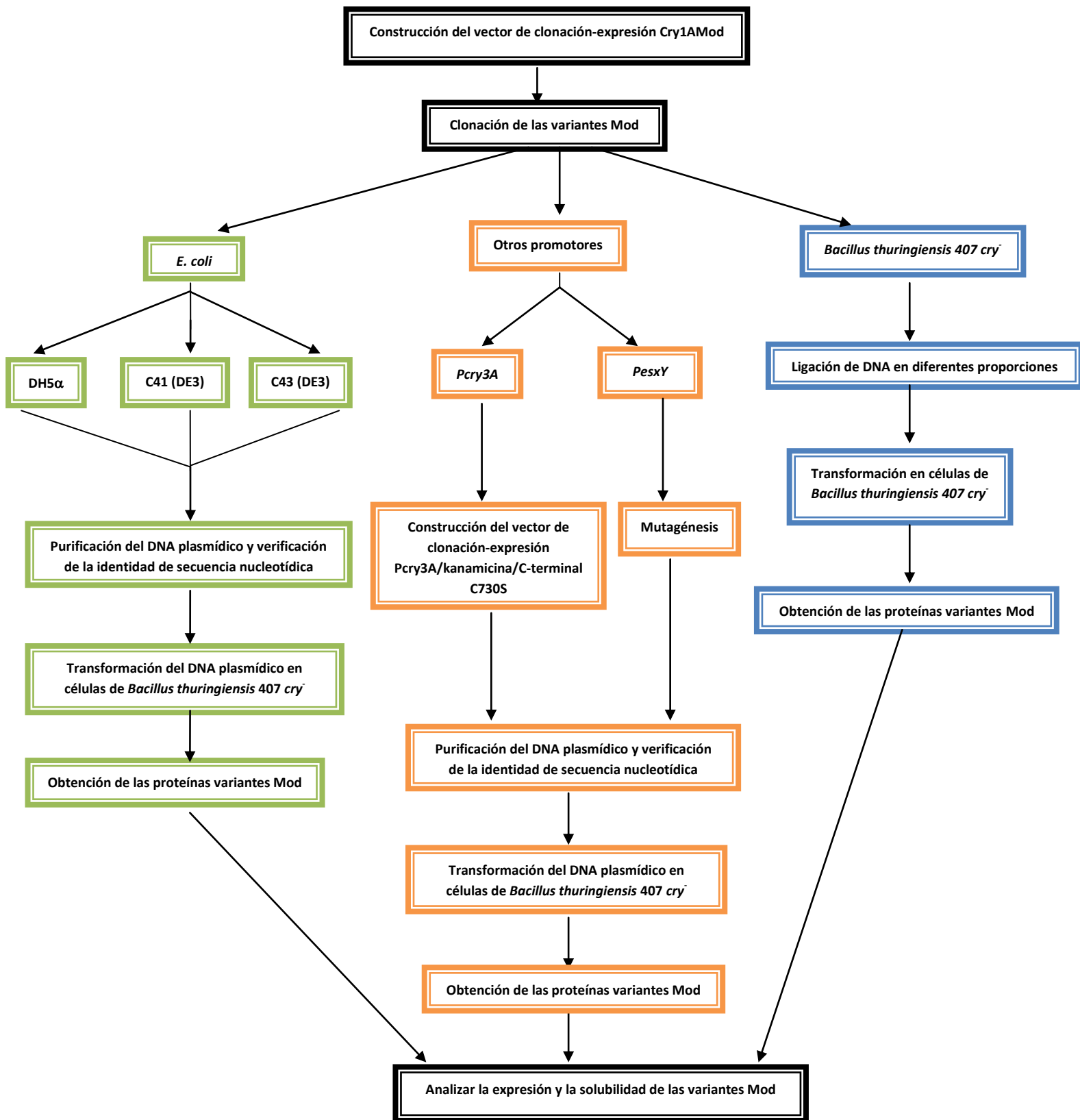


Figura 16. Diagrama de flujo de la estrategia propuesta.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cepas bacterianas

Los plásmidos que se obtuvieron se transformaron en las cepas que se enlistan a continuación:

Tabla 4. Cepas bacterianas.

Cepa	Genotipo
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80d/lacZ Δ M15 Δ (/lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ -
<i>E. coli</i> C41 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gen 1 ind1 sam7 nin5])
<i>E. coli</i> C43 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gen 1 ind1 sam7 nin5])
Bt 407-	

La cepa C41 (DE3) es derivada de BL21 (DE3), tiene una mutación la cual previene muerte celular asociada a la expresión de proteínas recombinantes tóxicas. La cepa C43 (DE3) es derivada C41 (DE3) por selección de resistencia a diferentes proteínas tóxicas.

7.2 Diseño de oligonucleótidos

El vector pHT315 tiene dos orígenes de replicación, uno para Bt y otro para *E. coli*. Con la finalidad de ensamblar las construcciones en este vector, se diseñaron los oligonucleótidos con el programa Oligo 7 (*Oligo Primer Analysis Software*). Algunos oligonucleótidos se utilizaron para generar sitios de restricción y así poder realizar las ligaciones de DNA, los sitios se indican con una línea. Los siguientes oligonucleótidos se sintetizaron en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM mediante el método del fosfite-triéster en fase sólida.

Tabla 5. Lista de oligonucleótidos.

Oligo	Tamaño (pb)	Secuencia (5'-3') y sitio de restricción
1. 1AcMod VPG (forward)	26	ACT <u>CCA TGG CAG TTC CCG GTG CTG G</u> <i>NcoI</i>
2. 1AcMod GPS (forward)	27	TGG ATC <u>CAT GGC</u> AGG TCC CTC TCA ATG <i>NcoI</i>
3. 1AcMod SLS (forward)	27	GAA <u>GCC ATG GCA</u> TCC TTG TCG CTA ACG <i>NcoI</i>
4. 1AcMod LLS (forward)	30	CAG AGC <u>CAT GGC</u> ACT TTT GAG TGA ATT TGT <i>NcoI</i>
5. 1AcMod IIW (forward)	34	TAA CGC <u>CAT GGC</u> AAT AAT ATG GGG AAT TTT TGG T <i>NcoI</i>
6. 1AcMod EQL (forward)	34	TTG AGC <u>CAT GGC</u> AGA ACA GTT AAT TAA CCA AAG A <i>NcoI</i>

7. 1AcMod RNQ (forward)	30	CCT AAC <u>CAT GGC</u> TAG GAA CCA AGC AAT TCC <i>NcoI</i>
8. 1AcWT (forward)	38	AGA GAT GGA GGT AAC CCA TGG ATA ACA ATC CGA ACA TC
9. Kan-pJH (forward)	26	CAT <u>GCC ATG GGA</u> GGT GAT AGG TAA GA <i>NcoI</i>
10. Kan-pJH (reverse)	24	CGC <u>GGA TCC</u> CCC TAT CTA GCG AAC <i>BamHI</i>
11. Kanamicina (forward)	26	CAT <u>GCC ATG G</u> GAG GTG ATA GGT AAG A <i>NcoI</i>
12. Kanamicina (reverse)	24	CGC <u>GGA TCC</u> CCC TAT CTA GCG AAC <i>BamHI</i>
13. P1GR (forward)	28	CCC AAG CTT GCA GGT AAA TGG TTC TAA C
14. P2GR (reverse)	24	GAT TGT TAT CCA TGG GTT ACC TCC
15. 1AcModNco (forward)	25	TGG ATC <u>CAT GGC</u> AGG ACT AGT TGA T <i>NcoI</i>
16. P7Ale (forward)	29	CAG TTA CTG CAA <u>GGA TCC</u> AGG ATC CAG GCT GAA TAT <i>BamHI</i>
17. P4Ale (reverse)	25	AGT AAC <u>CCC GGG</u> GCT CCA TCT ACA <i>SmaI</i>
11. alfa5r (reverse)	34	TTA GGT ACC TAA TTG TCC AAA CAC TGA AAC ATC T
12. P6ALE (reverse)	29	ATA TTC AGC CTG <u>GAT CCT</u> TGC AGT AAC TG <i>BamHI</i>
13. pHT315 (forward)	22	GCT TCC GGC TCG TAT GTT GTG T
14. pHT315 (reverse)	25	GGG TTA TTG TTC TCA TGA CCG GAT AC
15. ³⁹ SLS (forward)	18	TCC TTG TCG CTA ACG CAA
16. ⁴⁶ LLS (forward)	21	CTT TTG AGT GAATTT GTT CCC
17. ⁵¹ VPG (forward)	18	GTT CCC GGT GCT GGA TTT
18. ⁵⁷ VLG (forward)	26	GTG TAA GGA CTA GTT GAT ATA ATA TG
19. ⁶³ IHW (forward)	22	ATA ATA TGG GGA ATT TTT GGT C
20. ⁶⁹ GPS (forward)	18	GGT CCC TCT CAA TGG GAC
21. ⁸¹ EQL (forward)	25	GAA CAG TTA ATT AAC CAA AGA ATA G

22. ⁹³ RNQ (forward)	20	AGG AAC CAA GCC ATT TCT AG
23. PesxY1Ac (reverse)	23	CAT AAG TTA CCT CCA TCT TTA AG

7.3 Amplificaciones de DNA por PCR

Las amplificaciones de DNA se llevaron a cabo con la enzima *AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), siguiendo las especificaciones del proveedor, que se muestran a continuación:

Tabla 6. Condiciones de PCR.

REACTIVO	VOLUMEN
1. Buffer <i>AccuPrime™ Pfx</i> 10X	5 µL
2. Oligo <i>forward</i> 10 pmol/µL	1 µL
3. Oligo <i>reverse</i> 10 pmol/µL	1 µL
4. Templado de DNA 10 ng/µL	1 µL
5. Enzima DNA Polimerasa <i>AccuPrime™ Pfx</i>	0.5 µL
6. H ₂ O libre de nucleasas	41.5 µL
Volumen final	50 µL

El programa utilizado en el termociclador fue el siguiente:

94°C	2 minutos	Un ciclo
94°C	15 segundos	} 30 ciclos
55°C	30 segundos	
68°C	1 min/kb	
68°C	10 minutos	Un ciclo
4°	∞	

7.4 PCR mutagénico

Las deleciones se llevaron a cabo con el kit comercial *Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit* (New England, Biolabs) siguiendo las especificaciones del proveedor, que se muestran a continuación:

Tabla 7. Condiciones del PCR mutagénico.

REACTIVO	VOLUMEN
1. Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	12.5
2. Oligo <i>forward</i> 10 μ M	1.25
3. Oligo <i>reverse</i> 10 μ M	1.25
4. Templado de DNA 1-25ng/ μ L	1
6. H ₂ O libre de nucleasas	9
Volumen final	25 μ L

El programa utilizado en el termociclador fue el siguiente:

98°C	30 segundos	Un ciclo
98°C	10 segundos	} 30 ciclos
55°C	10 segundos	
72°C	30 seg/kb	
72°C	2 minutos	Un ciclo
4°	∞	

Posteriormente el producto de PCR requiere de un tratamiento con las enzimas: Kinasa, Ligasa y DpnI, bajo las siguientes condiciones:

Tabla 8. Tratamiento del producto de PCR mutagénico

REACTIVO	VOLUMEN
Producto de PCR	1
Buffer de reacción KLD 2X	5
Mix enzyme KLD10X	1
H ₂ O libre de nucleasas	3
Volumen final	10 μ L

La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Finalmente se transformaron 5 μ L en células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α .

7.5 Ligación de DNA

Las ligaciones de DNA se llevaron a cabo con la enzima *T4 DNA Ligase* (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA) en una relación molar de 1:3 (vector/inserto), siguiendo las especificaciones del proveedor, que se muestran a continuación:

Tabla 9. Condiciones de ligación de DNA.

REACTIVO	VOLUMEN
1. Vector linearizado	100 ng
2. Inserto	En relación molar 1:3
3. Buffer <i>T4 DNA Ligase</i> 10X	2 μ L
4. Enzima <i>T4 DNA Ligase</i>	2 μ L
5. H ₂ O libre de nucleasas	A 20 μ L
Volumen final	20 μ L

Las reacciones de ligación se incubaron a 16°C toda la noche, al día siguiente se desactivó la enzima a 65°C durante 10 minutos.

7.6 Electroforesis de DNA

Se tomaron alícuotas de cada muestra de DNA (plasmídico o producto de PCR) para cargarlas en geles de agarosa al 1% con 0.04% de bromuro de etidio (10 mg/mL). Se utilizó una cámara *Mini Horizontal Submarine Unit Hoefer HE* (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) con buffer TAE 1X. La electroforesis se realizó aplicando 100 V durante un tiempo aproximado de 50 minutos. Se utilizaron marcadores de peso molecular de 1 kb (Fermentas vía Thermo Scientific, Pittsburgh, PA). Para cuantificar la concentración de DNA se utilizó un equipo espectrofotométrico *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA).

7.7 Purificación de plásmidos bacterianos

Para la purificación de plásmidos a partir de células transformadas de *E. coli*, se utilizó el kit comercial *QIAprep Spin Miniprep kit* (QIAGEN, Valencia, CA), siguiendo las especificaciones del proveedor. Los plásmidos se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

7.8 Purificación de DNA a partir de gel de agarosa

Se cargó un volumen de muestra de DNA (digerida previamente con enzimas de restricción) en un gel de agarosa al 1% con buffer de corrida TAE 1X y se sometió a electroforesis a 100 V, por un tiempo aproximado de 50 minutos. El gel fue expuesto brevemente a la luz ultravioleta (365 nm) de una lámpara de 6 W (FOTODYNE

Incorporated, Hartland, WI), para cortar una rebanada de gel que contenía la banda del peso deseado. Para la purificación de DNA a partir del gel se utilizó el kit comercial *MinElute Gel extraction kit* (QIAGEN, Valencia, CA).

7.9 Obtención de células calcio competentes *E. coli* DH5 α , C41 (DE3) y C43 (DE3)

Se estriaron las células de *E. coli* en una placa de Petri con medio LB sin antibiótico y se incubó toda la noche a 37°C. Al día siguiente se creció una colonia en 10 mL de medio LB líquido a 200 rpm toda la noche a 37°C. En la mañana siguiente se tomó un 1 mL del cultivo y se transfirió a un matraz Fernbach con 100 mL de medio LB líquido. Se dejó en agitación a 200 rpm hasta que el cultivo alcanzó una $DO_{600} = 0.35-0.4$, las células se colocaron inmediatamente en hielo durante 20 minutos.

Posteriormente el medio de cultivo se dividió en dos tubos Falcon de 50 mL y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y las células se re-suspendieron en 100 mL de 0.1 M de $CaCl_2$ frío y se mantuvieron en hielo durante 20 minutos. Los tubos Falcon se centrifugaron nuevamente a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y las células se re-suspendieron en 100 mL de 0.1 M de $CaCl_2$ / 15% de glicerol frío. Se repitió la centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y la pastilla se re-suspendió en 5 mL de 0.1 M de $CaCl_2$ / 15% de glicerol frío. Finalmente se prepararon alícuotas de 200 μ L en tubos de pp estériles de 1.5 mL y se mantuvieron a -70°C hasta su utilización.

7.10 Obtención de células electrocompetentes *Bt 407 cry*

La cepa acristalífera *Bt 407 cry* se sembró en una placa de Petri con medio BHI sin antibiótico y se incubó a 30°C toda una noche. En la mañana siguiente se rasparon células que crecieron en la placa en un tubo Falcon de 15 mL con 5 mL de medio BHI hasta obtener una $DO_{600} = 0.05-0.06$ y se transfirió un 1 mL de células a un matraz Fernbach con 100 mL de medio BHI líquido y se dejó en agitación a 200 rpm a 30°C hasta obtener una $DO_{600} = 0.6$.

Posteriormente el volumen total del matraz se dividió en dos tubos Falcon de 50 mL y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Las células se re-suspendieron en H_2O estéril fría y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C, este lavado se repitió una vez más. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se re-suspendió en 1 mL de PEG₃₆₀₀ al 40% estéril y frío. Se prepararon alícuotas en tubos de pp estériles de 1.5 mL. Las alícuotas de células se utilizaron al momento.

7.11 Transformación de células calcio competentes *E. coli* DH5 α , C41 (DE3) y C43 (DE3)

Se añadió de 10 a 40 ng de DNA plasmídico a una alícuota de células, los tubos se incubaron en hielo durante 30 minutos. La reacción se transfirió a 42°C durante 2 minutos. Posteriormente se incubó en hielo durante 5 minutos. Se añadieron 800 μ L de medio SOC a cada tubo y se incubaron a 37°C a 200 rpm durante una hora.

Las bacterias transformadas fueron sembradas en volúmenes de 200 y 250 μ L mediante dispersión con perlas estériles, en placas de medio LB sólido suplementado con ampicilina (100 μ g/mL). Se incubaron a 37°C toda la noche. Como control negativo de transformación se utilizó una alícuota de células sin que se adicionara DNA plasmídico.

7.12 Transformación de células electrocompetentes

Células electrocompetentes de Bt 407 *cry*⁻

Se utilizó la cepa acristalífera Bt 407 *cry*⁻ para electroporación. Se adicionaron 5 μ g de DNA plasmídico a cada alícuota de células de Bt electrocompetentes, se dejaron en hielo durante 5 minutos y se transfirieron a celdas *Gene Pulser Cuvette* de 0.4 cm (Bio-Rad vía Life Science Research, Hercules, CA).

Se sometieron a un pulso eléctrico de 2.5 V, 1000 Ω y 25 μ FD en un equipo *Gene Pulser* (Bio-Rad vía Life Science Research, Hercules, CA). Después del pulso eléctrico, se adicionaron 500 μ L de BHI suplementado con eritromicina 0.2 μ g/mL y se recuperaron a 30°C con agitación de 200 rpm durante una hora. Las células se sembraron en placas de medio LB sólido con eritromicina (10 μ g/mL) con 100 μ L de la suspensión de bacterias, dispersada con perlas estériles y se incubaron a 30°C durante toda una noche. Como control negativo de electroporación se utilizó una alícuota de células sin que se adicionara DNA plasmídico.

7.13 PCR en colonia

a) PCR a partir de células de *E. coli*

Para seleccionar las colonias transformadas con el plásmido deseado, se realizó PCR de colonia a partir de una suspensión celular de cada colonia en 30 μ L de agua libre de nucleasas, posteriormente se colocaron en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos y se tomaron 3 μ L como templado. Se utilizó el *PCR Master Mix* (Fermentas, Thermo Scientific, Pittsburgh, PA) siguiendo las especificaciones del proveedor, que se muestran a continuación:

Tabla 10. Condiciones de PCR en colonia de *E. coli*.

REACTIVO	VOLUMEN
1. PCR Master Mix 2X	12.5 μ L
2. Oligo <i>forward</i> 10 pmol/ μ L	0.4 μ L
3. Oligo <i>reverse</i> 10 pmol/ μ L	0.4 μ L
4. Templado	3 μ L
5. H ₂ O libre de nucleasas	8.7 μ L
Volumen final	25 μ L

El programa utilizado en el termociclador fue el siguiente:

95°C	3 minutos	Un ciclo
95°C	30 segundos	} 30 ciclos
55°C	30 segundos	
72°C	1 min/kb	
72°C	10 minutos	Un ciclo

Posterior a la amplificación de DNA, se utilizaron 10 μ L para analizarlos en un gel de agarosa al 1% con 0.04% de bromuro de etidio (10 mg/mL).

b) PCR a partir de células de *B. thuringiensis*

Para corroborar la presencia del plásmido deseado en las células de Bt transformadas se realizaron PCR de colonia. Se estriaron las bacterias de cada colonia en una placa de LB con eritromicina (10 μ g/mL) y se incubó por un período de 4 a 5 horas a 30°C o hasta ver un leve crecimiento de colonias transparentes que corresponde a bacterias en fase vegetativa. Se tomó un inóculo de la placa y se mezcló en 50 μ L de agua libre de nucleasas en un tubo de pp estéril de 0.5 mL. Las muestras se colocaron en un congelador a -20°C, al día siguiente se colocaron en un baño de agua en ebullición durante 10 minutos para finalmente ser puestas en hielo. Se utilizó el PCR Master Mix (Fermentas, Thermo Scientific, Pittsburgh, PA) siguiendo las especificaciones del proveedor, que se muestran a continuación:

Tabla 11. Condiciones de PCR en colonia de *Bt*.

REACTIVO	VOLUMEN
1. <i>PCR Master Mix 2X</i>	25 μ L
2. Oligo <i>forward</i> 10 pmol/ μ L	1 μ L
3. Oligo <i>reverse</i> 10 pmol/ μ L	1 μ L
4. Templado	10 μ L
5. H ₂ O libre de nucleasas	13 μ L
Volumen final	50 μ L

El programa utilizado en el termociclador fue el siguiente:

95°C	3 minutos	Un ciclo
95°C	30 segundos	} 30 ciclos
55°C	30 segundos	
72°C	1 min/kb	
72°C	10 minutos	Un ciclo

Posterior a la amplificación de DNA, se utilizaron 10 μ L para analizarlos en un gel de agarosa al 1% con 0.04% de bromuro de etidio (10 mg/mL).

7.14 Secuenciación de DNA

A partir de los plásmidos purificados con el kit *QIAGEN* mencionado, se realizó la secuencia del DNA en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM. Los resultados fueron analizados a partir de los datos mostrados en el programa BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA); un programa informático que permite analizar las secuencias de DNA. Los resultados se compararon mediante *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST; NIH, Montgomery, Md); un programa informático de alineamiento de secuencias de DNA, RNA o de proteínas.

7.15 Obtención de la suspensión de espora-cristal

Las cepas de *Bt* transformadas con las construcciones realizadas fueron sembradas en placas con medio HCT sólido con eritromicina (10 μ g/mL) y se incubaron a 30°C durante 3 días para favorecer la esporulación de las bacterias y la formación de cristales de proteína. Mediante revisión al microscopio óptico con un objetivo de 100X, se detectó si las bacterias esporuladas producían los cristales bipiramidales típicos de Cry1A. La biomasa de cada placa de Petri fue colectada, mediante raspado, en un tubo de pp estéril de 1.5 mL con agua más PMSF 1mM. Las muestras fueron mantenidas a 4°C hasta el momento de

ser utilizadas en bioensayos o electroforesis y durante los experimentos fueron mantenidas en hielo.

7.16 Cuantificación de proteínas

Se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976) para cuantificar la proteína total. Se tomó una alícuota de la muestra (por ejemplo: espora-cristal) y se aforó a 800 μL con agua destilada; se adicionaron 200 μL del reactivo de *Bradford* (Bio-Rad Protein Assay, vía Life Science Research, Hercules, CA), se agitó la muestra y se incubó la reacción por cinco minutos. La absorbancia de las muestras fue determinada en un espectrofotómetro (Beckman Coulter, Indianapolis, IN) en la longitud de onda de 595 nm. La concentración fue calculada a partir de una curva patrón realizada con albúmina sérica bovina (BSA).

7.17 Electroforesis de proteínas

Las muestras de espora-cristal fueron sometidas a ensayos de electroforesis utilizando geles de acrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes. Las muestras fueron adicionadas con mezcla lítica 4X y hervidas en baño maría por 5 minutos. La electroforesis se realizó en cámaras *Tall mighty small* (Hoefer Scientific Instruments, Holliston, MA) con buffer de corrida. Se cargaron en el gel y se aplicaron 10 mA hasta que el frente de corrida llegó al separador, posteriormente se aplicaron 20 mA hasta que el frente de corrida salía del gel. El gel se enjuagó con agua destilada tres veces durante 5 minutos cambiando el agua cada vez y se tiñó con el colorante Coomassie Bradford (Bio-Rad Protein Assay, vía Life Science Research, Hercules, CA) hasta observar bandas.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Construcción del vector de expresión pHT315-P1P2-Kan

Con la finalidad de expresar las variantes Mod de la toxina Cry1Ac, se construyó un vector de expresión, el cual contiene varios elementos que se describen a continuación y se puede observar un esquema del mismo en la **figura 17**:

Elemento	Descripción
1. pHT315	Es un vector que contiene un origen de replicación para <i>E. coli</i> , un origen de replicación para Bt, casete de resistencia al antibiótico eritromicina, casete de resistencia al antibiótico ampicilina y posee aproximadamente 15 ± 5 copias/cromosoma (Arantes y Lereclus, 1991).
2. Promotor P1P2	Son dos promotores transcripcionales que se encuentran sobrepuestos, se consideran promotores fuertes y se activan en distintas fases de la esporulación. Estos promotores son específicos para genes <i>cry1A</i> . El promotor P1 se encuentra activo durante la esporulación temprana-media y depende del factor σ^E . El promotor P2 se activa durante la esporulación tardía y depende del factor σ^K (Wong <i>et al.</i> , 1983).
3. Casete de resistencia a kanamicina	Es la región que se intercambi6 por los fragmentos correspondientes a cada variante Mod. Este casete permiti6 la selecci6n negativa de las clonas.
4. Fragmento C-terminal	En el extremo C-terminal de la toxina Cry1Ac, las protoxinas contienen 14 residuos de cisteína que forman enlaces disulfuro en las inclusiones cristalinas. Los residuos de cisteína en la protoxina est6n involucrados en la cristalizaci6n de las proteínas Cry de 130 kDa (Agaisse <i>et al.</i> , 1994; Du <i>et al.</i> , 1994), la reducci6n de estos enlaces es un paso limitante en la solubilidad de las protoxinas (Du <i>et al.</i> , 1994).

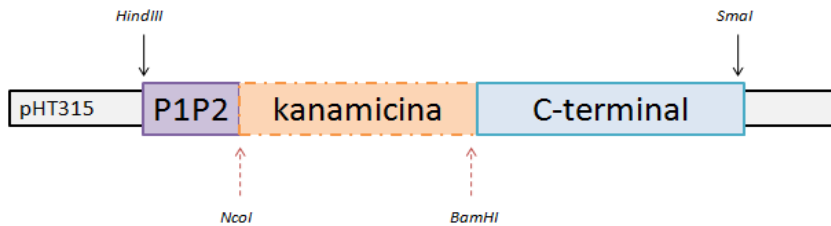


Figura 17. Representación esquemática del vector de expresión pHT315- P1P2-Kan. En color morado se encuentra el promotor P1P2 con los sitios de restricción *HindIII*-*NcoI*, en color anaranjado el casete de resistencia a kanamicina con los sitios *NcoI*-*BamHI* (fragmento a intercambiar por cada variante Mod), en color azul el fragmento C-terminal de *Cry1Ac* con los sitios *BamHI*-*SmaI* y en color gris el vector pHT315.

8.1.1 Amplificación de fragmentos por PCR

Para la obtención del vector de expresión pHT315-P1P2-Kan, se realizó la amplificación de DNA por PCR de cada fragmento que lo conforma:

- a) Promotor P1P2: se utilizó como templado el plásmido pHT3101 que contiene el promotor nativo del gen *cry1Ac* (GenBank: M11068.1), este fragmento se amplificó con los oligonucleótidos “P1GR *forward* -P2GR *reverse*” y el tamaño del producto obtenido fue de 292 pb.
- b) Casete de kanamicina: se utilizó como templado el plásmido pJH1 que contiene el gen de resistencia a *kanamicina* (GenBank: V01547.1), se amplificó con los oligonucleótidos “Kan-pJH *forward*- Kan-pJH *reverse*” y se obtuvo un producto de 1,000 pb.
- c) Fragmento C-terminal: se utilizó como templado el plásmido pHT3101 que contiene el fragmento C-terminal del gen *cry1Ac* (GenBank: M11068.1), este fragmento se amplificó con los oligonucleótidos “P7Ale *forward* -P4Ale *reverse*” y el tamaño del producto obtenido fue de 2,069 pb.

Posteriormente cada fragmento se clonó en el vector pJET 1.2 (Fermentas) de manera independiente con la finalidad de corroborar la identidad de su secuencia nucleotídica. Cada plásmido pJET 1.2 con los fragmentos que integrarían al vector de expresión pHT315-P1P2-Kan se digirió con enzimas de restricción descritas en la **tabla 12**. Se realizaron reacciones de ligación de los 3 insertos y el vector pHT315 en distintas proporciones, sin embargo no se obtuvo exitosamente.

Tabla 12. Descripción de las enzimas de restricción y tamaño esperado.

Fragmento	Enzimas de restricción	Tamaño (en pb)
Inserto 1: Promotor P1P2	<i>HindIII-NcoI</i>	292
Inserto 2: Casete de kanamicina	<i>NcoI-BamHI</i>	1,000
Inserto 3: C-terminal	<i>BamHI-SmaI</i>	2,069
Vector: pHT315	<i>HindIII-SmaI</i>	6,700

8.1.2 Ensamblaje por PCR del promotor P1P2 con el casete de kanamicina

Se planteó la posibilidad de que, probablemente, influía de manera sustancial la diferencia de peso molecular del promotor P1P2 contra los demás fragmentos, por lo tanto se decidió fusionar al promotor P1P2 con el casete de kanamicina para facilitar la obtención final del vector de expresión pHT315-P1P2-Kan. En la **figura 18** se observa una representación general de la estrategia de ensamblaje por PCR: en primer lugar se lleva a cabo la linearización de los plásmidos: Promotor P1P2-pJET 1.2 y Casete de kanamicina-pJET 1.2 con la enzima de restricción *NcoI*; el resultado se encuentra en la **figura 19**. Posteriormente se realizó una reacción de ligación en distintas proporciones molares. Estos productos de ligación se utilizaron como templado en el PCR con los oligonucleótidos específicos P1GR *forward* y Kanamicina *reverse*, el resultado de la amplificación se muestra en la **figura 20**.

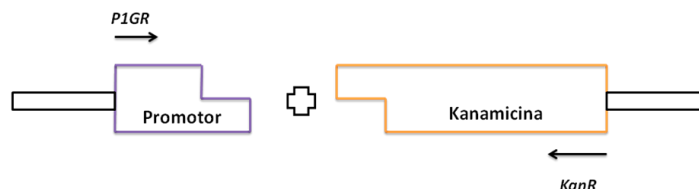


Figura 18. Representación de la estrategia de ensamblaje por PCR. En color morado se encuentra el promotor P1P2 y en color anaranjado el casete de kanamicina. Ambos plásmidos: Promotor P1P2-pJET 1.2 y Casete de kanamicina-pJET 1.2 se linearizaron en el sitio *NcoI*. La ligación se indica con el signo +, en flechas se indican los oligonucleótidos que se utilizaron.

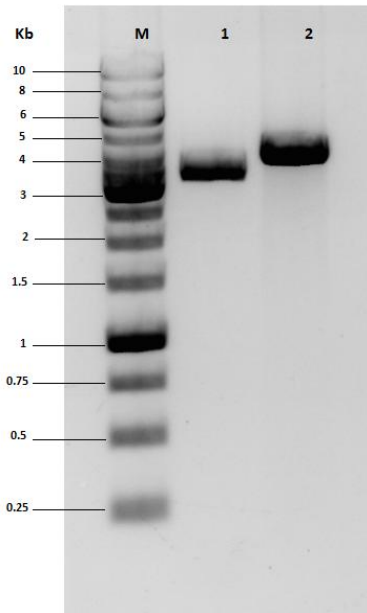


Figura 19. Linearización de los plásmidos en el sitio *Nco*I. Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. Carriles: **1)** Promotor P1P2-pJET 1.2 y **2)** Casete de kanamicina-pJET 1.2.

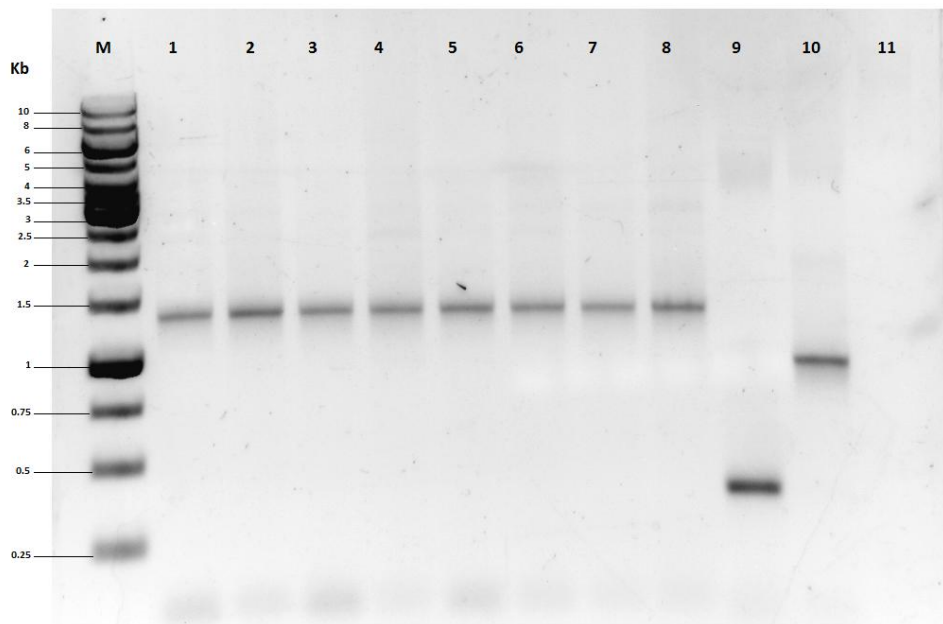


Figura 20. Resultado del ensamble por PCR del promotor P1P2 con el casete de kanamicina. Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. Carriles: **1)** Ligación en proporción 1:1 (Vector:Inserto), **2)** Ligación en proporción 1:3 (Vector:Inserto), **3)** Ligación en proporción 1:5 (Vector:Inserto), **4)** Ligación en proporción 1:9 (Vector:Inserto), **5)** Ligación en proporción 3:1 (Vector:Inserto), **6)** Ligación en proporción 3:3 (Vector:Inserto), **7)** Ligación en proporción 3:5 (Vector:Inserto), **8)** Ligación en proporción 3:9 (Vector:Inserto), **9)** Amplificación del promotor P1P2, **10)** Amplificación del casete de kanamicina y **11)** control negativo.

Posteriormente, el fragmento denominado “promotor P1P2-kanamicina” se clonó en el vector pJET 1.2 (Fermentas) y se corroboró su secuencia nucleotídica. Se digirió con las enzimas de restricción *HindIII-BamHI* y se realizó la ligación de fragmentos: 1) promotor P1P2-kanamicina, 2) C-terminal y 3) vector pHT315. Finalmente la ligación se transformó en células competentes de *E. coli* DH5 α .

El último paso para la utilización del vector de expresión pHT315-P1P2-Kan, consistió en la verificación de su integridad por secuenciación. Se eligieron cinco clonas al azar y se purificó el DNA plasmídico y se corroboró que no existieran defectos en la secuencia nucleotídica.

8.2 Estrategia A: clonación en cepas de *E. coli*

Se planteó la obtención de siete variantes Mod en total, cada una difiere en la longitud del extremo N-terminal. Para llevar a cabo esta estrategia se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar cada variante, en la **figura 21** se especifica el inicio de las construcciones planteadas y los oligonucleótidos que se utilizaron se encuentran descritos en la **tabla 5** de materiales y métodos.

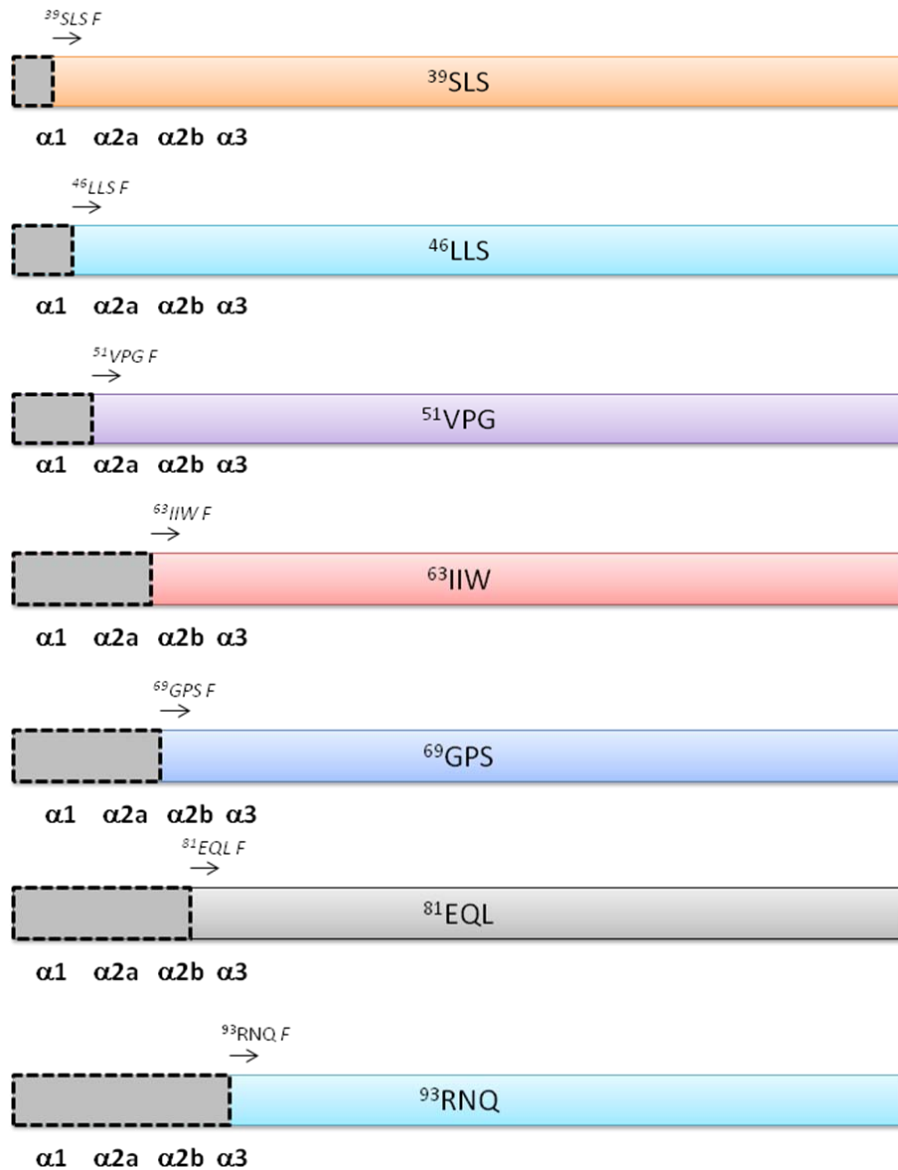


Figura 21. Esquema de las variantes Mod. En color gris se muestra el segmento que se elimina en cada construcción Mod. En flecha se indica el oligonucleótido *forward* para cada una de ellas. Se utilizó el mismo oligonucleótido *reverse* P6Ale.

Se amplificaron por PCR los fragmentos N-terminal de cada una de estas construcciones Mod y Cry1Ac silvestre con los oligonucleótidos específicos descritos en la **tabla 4** utilizando como templado el plásmido pHT3101. La **figura 22** muestra los fragmentos amplificados de cada variante. Estos productos de PCR fueron purificados y clonados individualmente en el vector pJET 1.2 (Fermentas). Finalmente se verificó la integridad de su secuencia nucleotídica.

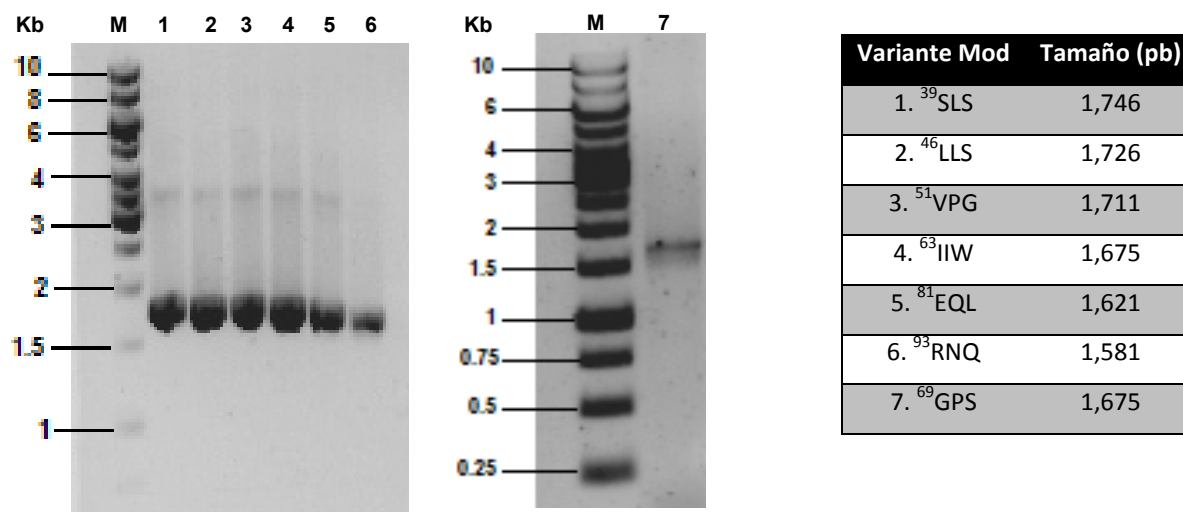


Figura 22. Resultado de la amplificación por PCR de cada variante Mod. Geles de agarosa al 1% teñidos con BrEt. Carriles: **1)** Variante Mod ³⁹SLS, **2)** Variante Mod ⁴⁶LLS, **3)** Variante Mod ⁵¹VPG, **4)** Variante Mod ⁶³IIW, **5)** Variante Mod ⁸¹EQL, **6)** Variante Mod ⁹³RNQ y **7)** Variante Mod ⁶⁹GPS.

El siguiente paso consistió en la purificación e introducción de estos fragmentos en el vector de expresión pHT315-P1P2-Kan construido previamente. Se determinó iniciar con la clonación de dos diferentes variantes Mod, denominadas ⁵¹VPG y ⁶⁹GPS para posteriormente continuar con las demás variantes. Se incluyó el control positivo Cry1Ac silvestre, este último con la finalidad de corroborar que el vector de expresión pHT315-P1P2-Kan funcionara correctamente. A continuación se describe el fundamento en la elección de ambas construcciones Mod:

- **Construcción ⁵¹VPG:** Está basada en un reporte publicado en 2001 en el cual se incubó a la protoxina Cry1Ab con el anticuerpo scFv73 (anticuerpo de cadena sencilla) que mimetiza a caderina, por una hora en proporción 1:1. Posteriormente se añadió la proteasa tripsina (proporción 1:20) o jugo gástrico de *M. sexta* (5%) una hora a 37°C y se formó una estructura oligomérica. Se secuenció la región correspondiente al N-terminal de la proteína digerida y se mostró que corresponde

a la secuencia ⁵¹VPGAG, que está localizada en el asa entre las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2a$ (Gómez *et al.*, 2001).

- **Construcción ⁶⁹GPS:** Se basa en la resolución de estructuras cristalográficas de las toxinas Cry4Ba (Boonserm *et al.*, 2005) y Cry5B (Hui *et al.*, 2012). La protoxina Cry4Ba se activó con la proteasa quimotripsina. Durante la proteólisis se eliminaron las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2b$ comenzando en el aminoácido G34, que corresponde al aminoácido G69 de Cry1A ubicado en el asa que une las hélices $\alpha 2a$ y $\alpha 2b$, y la proteína activada cristaliza en forma de trímero. Por otra parte, la protoxina Cry5B se activó con la proteasa elastasa y determinaron el sitio de corte mediante secuenciación del extremo N-terminal, comenzando en el aminoácido D113, que también corresponde al aminoácido G69 de Cry1A.

Los plásmidos ⁵¹VPG-pJET 1.2, ⁶⁹GPS-pJET 1.2 y Cry1Ac silvestre-pJET 1.2 se digirieron con las enzimas de restricción *NcoI-BamHI* para clonarlos en el vector de expresión pHT315-P1P2-Kan. Finalmente el producto de las ligaciones se transformó en las cepas de *E. coli* DH5 α , C43 y C44.

8.2.1 *E. coli* DH5 α

La cepa de *E. coli* DH5 α se utiliza de manera rutinaria para realizar experimentos de clonación, se desarrolló por Doug Hanahan en 1985 de ahí el acrónimo DH (Hanahan, 1985). El genotipo de la cepa DH5 α es el siguiente: F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG $\Phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta (lacZYA-argF)$ U169, hsdR17 ($r_K^- m_K^+$), λ^- . Una de las principales ventajas que ofrece esta cepa se debe a que presenta la mutación recA1 que elimina la recombinación homóloga y de esta manera preserva de manera integra la información del plásmido que se inserta.

Se transformaron en células competentes de *E. coli* DH5 α las ligaciones: *cry1Ac silvestre*, Mod ⁶⁹GPS y Mod ⁵¹VPG. Las colonias resultantes se analizaron por patrón de restricción; se tomaron dos colonias al azar resultantes de la transformación por construcción, incluyendo colonias del control *cry1Ac silvestre*. Se utilizaron las enzimas de restricción *NcoI-SmaI* las cuales liberan el fragmento que corresponde el gen completo en un tamaño aproximado de 4 kb. En la **figura 23** se encuentra el resultado del patrón de restricción, en los carriles 2 y 4 se observa que para la construcción *cry1Ac silvestre* se libera correctamente la banda del tamaño esperado en las dos colonias analizadas. En la construcción Mod ⁵¹VPG la clona número 1 perdió un sitio de restricción (carril 6) ya que el plásmido superenrollado se observa en el peso esperado (carril 5), la clona número 2 es la que libera la banda en el peso esperado (carril 8). Por último la clona número 1 de la

construcción ⁶⁹GPS libera la banda en el peso esperado (carril 10) y la clona número 2 no presenta el plásmido superenrollado con el peso esperado, sugiriendo que se llevó a cabo algún tipo de rearrreglo genético.

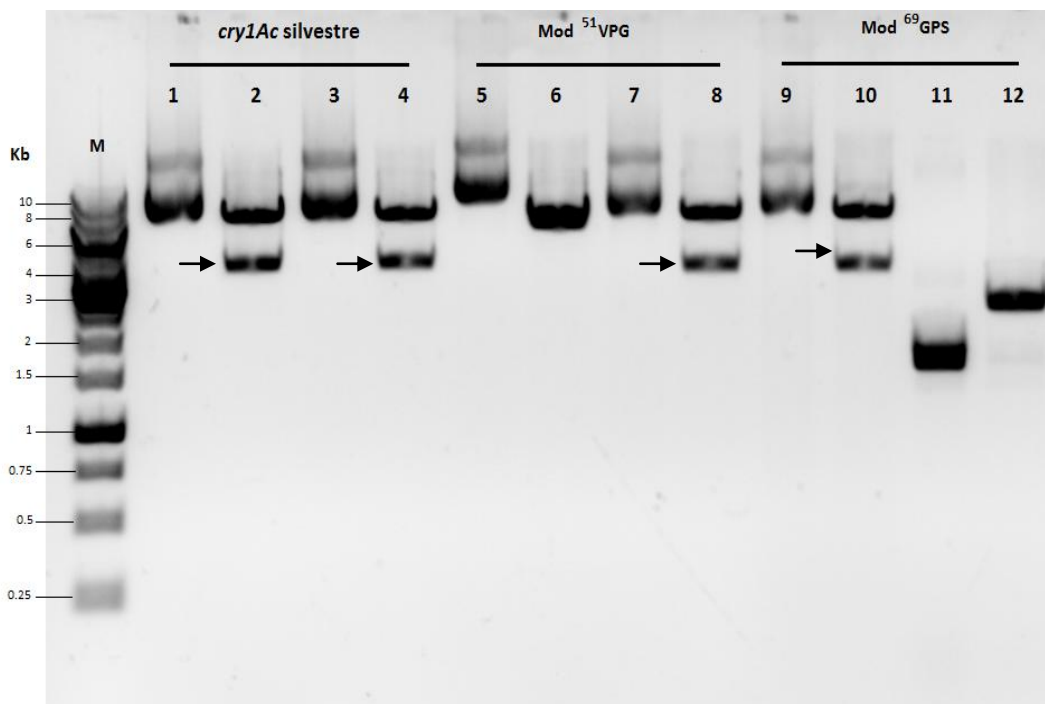


Figura 23. Análisis por patrón de restricción de las construcciones: Cry1Ac silvestre, Mod ⁵¹VPG y ⁶⁹GPS en *E. coli* DH5 α . Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. Con flechas se indican las clonas que liberan la banda que corresponde al gen completo en el tamaño esperado. Carriles: **1)** DNA superenrollado de la clona 1 de la construcción *cry1Ac silvestre*, **2)** Digestión de DNA de la clona 1 de la construcción *cry1Ac silvestre* con las enzimas de restricción *NcoI-SmaI*, **3)** DNA superenrollado de la clona 2 de la construcción *cry1Ac silvestre*, **4)** Digestión de DNA de la clona 2 de la construcción *cry1Ac silvestre* con las enzimas de restricción *NcoI-SmaI*, **5)** DNA superenrollado de la clona 1 de la construcción Mod ⁵¹VPG, **6)** Digestión de DNA de la clona 1 de la construcción Mod ⁵¹VPG con las enzimas de restricción *NcoI-SmaI*, **7)** DNA superenrollado de la clona 2 de la construcción Mod ⁵¹VPG, **8)** Digestión de DNA de la clona 2 de la construcción Mod ⁵¹VPG con las enzimas de restricción *NcoI-SmaI*, **9)** DNA superenrollado de la clona 1 de la construcción Mod ⁶⁹GPS, **10)** Digestión de DNA de la clona 1 de la construcción Mod ⁶⁹GPS con las enzimas de restricción *NcoI-SmaI*, **11)** DNA superenrollado de la clona 2 de la construcción Mod ⁶⁹GPS y **12)** DNA de la clona 2 de la construcción Mod ⁶⁹GPS con las enzimas de restricción *NcoI-SmaI*.

Las clonas que liberaron la banda correspondiente al gen en el tamaño esperado de aproximadamente 4 kb, se secuenciaron en su totalidad. En ambas colonias de la construcción *cry1Ac silvestre* no se encontraron defectos en su secuencia nucleotídica; es decir, el marco de lectura permanece correcto, este dato se correlaciona con los reportes de clonación de genes *cry* silvestres (Chambers *et al.*, 1991; Morse *et al.*, 2001; Asano *et al.*, 2003; Kurt *et al.*, 2005) inclusive con construcciones *cry1A* que presentan mutaciones

puntuales (Aranson *et al.*, 1995; Baum *et al.*, 1996; Ding *et al.*, 2008) en la cepa *E. coli* DH5 α .

Respecto a la clona 2 de la construcción Mod⁵¹VPG y la clona 1 Mod⁶⁹GPS se encontraron rearrreglos en el DNA plasmídico que ocasionan la pérdida de información codificante para estas construcciones (**tabla 13**). En el año 1992 se reportó la expresión del gen *cyt1A* en *E. coli*; al realizar el análisis de colonias independientes se encontró que, de manera similar al resultado de las construcciones Mod, se presentaron rearrreglos en el DNA plasmídico y concluyen que hay una fuerte selección contra la expresión del gen *cyt1A* (Douek *et al.*, 1992). Lo anterior podría indicar que en *E. coli* se expresan y que estas proteínas resultan tóxicas para las células de manera similar a lo reportado con el gen *cyt1A*.

Tabla 13. Resultado de la secuenciación de DNA perteneciente a las construcciones Mod⁵¹VPG y Mod⁶⁹GPS

Construcción	Deleciones	Inserciones	Sustituciones
Mod ⁵¹ VPG	51 nt	2 nt	14 nt
Mod ⁶⁹ GPS	56 nt	7 nt	10 nt

DH5 α es una de las cepas de *E. coli* que se utiliza con mayor frecuencia en experimentos de clonación de rutina (Budisa, 2005). Las ventajas que ofrece esta cepa se deben principalmente a las mutaciones en los genes *recA1* y *endA1* que incrementan la estabilidad del inserto y promueven la calidad del DNA que se obtiene al purificar DNA plasmídico (Taylor *et al.*, 1993). Los resultados de la secuenciación de los genes *Mod⁵¹VPG* y *Mod⁶⁹GPS* en *E. coli* DH5 α sugieren que, al transformar estas construcciones se activa un sistema de recombinación que es independiente de RecA que ocasiona la inestabilidad de los plásmidos en esta cepa.

A la fecha se han descrito otros sistemas con los que cuenta *E. coli* que están relacionados con rearrreglos en el DNA, por ejemplo: el sistema de reparación UV (*uvrC*) (Lin *et al.*, 1992; Verhoeven *et al.*, 200) y la vía de reparación SOS (*umuC*) (Woodgate *et al.*, 1989); se ha reportado que ambas proteínas están involucradas en la reparación de daños en el DNA que contengan secuencias repetidas invertidas largas (van Sluis *et al.*, 1983; Elledge *et al.*, 1983). Las proteínas SbcC (Connelly y Leach, 1996) y RecJ (Shizuya *et al.*, 1996) están involucradas en ciertos tipos de recombinación, se ha observado que mutaciones en estos genes incrementan la estabilidad de estructuras de DNA-Z (Yamaguchi *et al.*, 2000; Asai *et al.*, 1993). La inestabilidad de los plásmidos también se ha asociado con secuencias repetidas múltiples (Bichara *et al.* 2000, Kang y Cox 1996), secuencias ricas en AT (Godishka *et al.*, 2009) o secuencias propensas a la formación de estructuras secundarias (Razin *et al.* 2001).

Asimismo, la inestabilidad de un plásmido puede ser influenciado por un número de factores que incluyen: la expresión de genes tóxicos, carga metabólica por el mantenimiento del plásmido, el número de copias de un plásmido, intensa presión de selección positiva para un segmento particular del plásmido (por ejemplo, gen de resistencia a antibiótico), el genotipo de la cepa huésped y el potencial recombinogénico de secuencias presentes en el plásmido (Corchero y Villaverde 1998).

Teniendo en cuenta que la diferencia entre la construcción Cry1Ac silvestre y las variantes Mod⁵¹VPG y Mod⁶⁹GPS reside en la carencia de residuos nucleotídicos hacia el extremo N-terminal, se planteó la posibilidad de que los genes se expresaran en *E. coli* y que la expresión de los genes Mod resultara tóxica para esta cepa, por consiguiente *E. coli* activaría algún sistema de recombinación que termina en el rearreglo de los plásmidos Mod, modificando su información y evitando su expresión en esta cepa.

Con la finalidad de corroborar la eficiencia del vector de expresión pHT315-P1P2-Kan, se transformó el plásmido de la construcción *cry1Ac silvestre* proveniente de *E. coli* DH5 α en células acristalíferas de *B. thuringiensis*. En la **figura 24** se puede apreciar que la construcción *cry1Ac silvestre* se expresa correctamente, este resultado indica que la construcción del vector fue correcta y que este vector es útil para clonar genes silvestres.

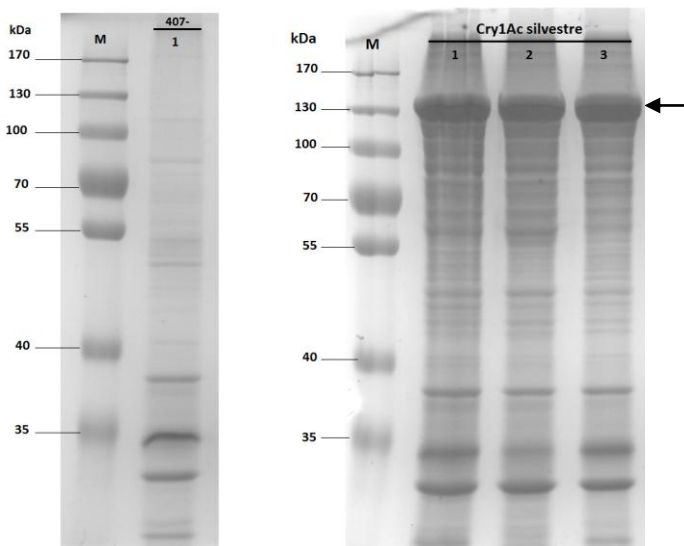


Figura 24. SDS-PAGE al 15% teñidos con azul de Coomassie. Proteína total de cultivos esporulados de Bt. Izquierdo: Carril: **1)** *Bt 407- cepa acristalífera*. Derecho: Carriles: **1)** Cry1Ac silvestre clona 1, **2)** Cry1Ac silvestre clona 2, **3)** Cry1Ac silvestre clona 3. La flecha indica la banda con el peso esperado de la proteína Cry1Ac silvestre.

8.2.2 *E. coli* C41 (DE3) y C43 (DE3)

Las cepas de *E. coli* C41 (DE3) y C43 (DE3) son derivadas de BL21 (DE3), se utilizan para expresar proteínas que resultan tóxicas en *E. coli*. La cepa C41 (DE3) es derivada de BL21 (DE3), tiene una mutación la cual previene muerte celular asociada a la expresión de proteínas recombinantes tóxicas. La cepa C43 (DE3) es derivada C41 (DE3) por selección de resistencia a diferentes proteínas tóxicas. El genotipo de estas cepas se enuncia a continuación: F^- ompT gal dcm lon hsd_SB (r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gen 1 ind1 sam7 nin5]) (Miroux y Walker, 1996). Se propuso utilizar ambas cepas para la clonación de las variantes Mod.

Se transformaron las ligaciones de las construcciones *cry1Ac silvestre*, *Mod*⁵¹*VPG* y *Mod*⁶⁹*GPS* en células calcio competentes de *E. coli* C41 (DE3) y C43 (DE3). Posteriormente las colonias que crecieron se analizaron por patrón de restricción que se observa en la **figura 25**, ninguna de las colonias fue positiva, encontrando deleciones en los plásmidos y pérdida de sitios de restricción. Este experimento se realizó únicamente en una ocasión.

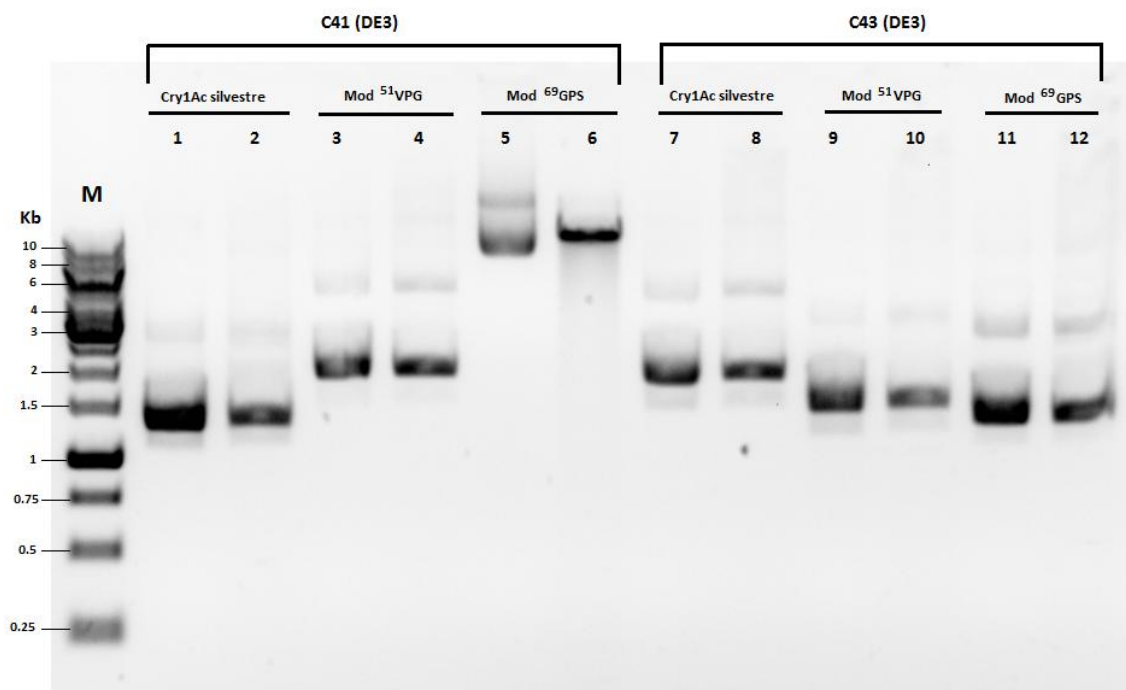


Figura 25. Análisis por patrón de restricción de las construcciones: *Cry1Ac silvestre*, *Mod*⁵¹*VPG* y *Mod*⁶⁹*GPS* en *E. coli* C41 (DE3) y C43 (DE3). Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. Carriles: **1)** DNA superenrollado de la construcción *Cry1Ac silvestre* en C41, **2)** Digestión de DNA de la construcción *Cry1Ac silvestre* con las enzimas de restricción *NcoI-SmaI* en C41, **3)** DNA superenrollado de la construcción *Mod*⁵¹*VPG* en C41, **4)** Digestión de DNA de la construcción *Mod*⁵¹*VPG* con las enzimas de restricción *NcoI-SmaI* en C41, **5)** DNA superenrollado de la construcción *Mod*⁶⁹*GPS* en C41, **6)** Digestión de DNA de la construcción *Mod*⁶⁹*GPS* con las enzimas de restricción *NcoI-SmaI* en C41, **7)** DNA superenrollado de la construcción *Cry1Ac silvestre* en C43, **8)** Digestión de DNA de la construcción *Cry1Ac silvestre* con las enzimas de restricción *NcoI-SmaI* en C43, **9)** DNA superenrollado de la construcción *Mod*⁵¹*VPG* en C43, **10)** Digestión de DNA de la construcción *Mod*⁵¹*VPG* con las enzimas de restricción *NcoI-SmaI* en C43, **11)** DNA superenrollado de la construcción *Mod*⁶⁹*GPS* en C43 y **12)** DNA de la construcción *Mod*⁶⁹*GPS* con las enzimas de restricción *NcoI-SmaI* en C43.

Se ha demostrado que estas cepas representan un gran potencial para expresar proteínas tóxicas principalmente proteínas de membrana, algunas proteínas citoplasmáticas y nucleasas de eubacterias, levaduras, virus y mamíferos (Chan *et al.*, 2004; Rahaman *et al.*, 2003; Schimmele *et al.*, 2005; O'Brien *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2002). Sin embargo, a la fecha no existen reportes de expresión de proteínas Cry en estas cepas de *E. coli*. En particular, respecto al género *Bacillus* únicamente se han expresado: 12 proteínas del género *Bacillus subtilis*, una proteína de *Bacillus pseudofirmus* y una proteína de *Bacillus pasteurii*, sin embargo, no presentan homología con proteínas Cry.

Tabla 14. Proteínas del género *Bacillus* expresadas en *E. coli* C43 (DE3) y C44 (DE3).

Proteína	Organismo	Referencia
1. OpuA	<i>Bacillus subtilis</i>	Horn <i>et al.</i> , 2005.
2. PS3 alanina/ acarreador H+	<i>Bacillus subtilis</i>	Miroux y Walker, 1996.
3. Pirofosfatasa	<i>Bacillus subtilis</i>	Parfenyev <i>et al.</i> , 2001
4. Factor anti-sigma SpoIIAB	<i>Bacillus subtilis</i>	Evans <i>et al.</i> , 2003.
5. SpoIIIE	<i>Bacillus subtilis</i>	Lucet <i>et al.</i> , 2000; Lucet <i>et al.</i> , 1999; Feucht <i>et al.</i> , 2000; Searls <i>et al.</i> , 2004.
6. Ureasa	<i>Bacillus subtilis</i>	Kim <i>et al.</i> , 2005.
7. YukD	<i>Bacillus subtilis</i>	van den Ent <i>et al.</i> , 2005.
8. YvcC	<i>Bacillus subtilis</i>	Chami <i>et al.</i> , 2002; Steinfels <i>et al.</i> , 2002.
9. BcrC	<i>Bacillus subtilis</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2005.
10. FtsZ	<i>Bacillus subtilis</i>	Palmieri <i>et al.</i> , 1996; Löwe <i>et al.</i> , 2001.
11. MotPS	<i>Bacillus subtilis</i>	Ito <i>et al.</i> , 2004.
12. MraY translocasa	<i>Bacillus subtilis</i>	Bouhss <i>et al.</i> , 2004.
13. OF4 ATP sintasa (subunidad c)	<i>Bacillus pseudofirmus</i>	Rivera-Torres <i>et al.</i> , 2004.
14. Citocromo c	<i>Bacillus pasteurii</i>	Banci <i>et al.</i> , 2002.

En cuanto a la manera como se han clonado los genes que se desea expresar en estas cepas existe una diferencia importante entre el procedimiento de rutina y el empleado en este apartado; de manera rutinaria los genes se clonan en vectores de expresión T7 RNA polimerasa regulado por el promotor lacUV5, cuya actividad se induce por medio de la adición del inductor IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) en la fase log del crecimiento bacteriano. En contraste, la transcripción de las construcciones es dirigida por el promotor P1P2 y no necesita algún inductor, al parecer se expresa de manera constitutiva, esto puede ocasionar una carga metabólica extra a la célula generando como mecanismo de defensa rearrreglos en el DNA plasmídico. De acuerdo con estos resultados es muy importante regular la expresión de las proteínas tóxicas en *E. coli* para mantener la integridad del DNA plasmídico y por lo tanto obtener una expresión correcta de la proteína. La conclusión de este apartado es que la clonación y/o expresión de las variantes Mod y la toxina Cry1Ac silvestre bajo el promotor P1P2 en las ambas cepas no resultó ser óptima.

8.3 Estrategia B: Expresión de las variantes Mod bajo los promotores *Pcry3A* y *PexsY*

Con base en los datos negativos obtenidos de la clonación de las variantes en *E. coli* bajo el promotor P1P2 y bajo la hipótesis de que es la expresión en fuga en estas células la que genera rearrreglos en el DNA plasmídico, en la siguiente estrategia se planteó el uso de promotores alternativos al P1P2. La elección de los promotores *Pcry3A* y *PexsY* fue con dos condiciones: 1) que no presentaran expresión en *E. coli* para obtener DNA plasmídico sin errores y así poder transformar en Bt y 2) que fueran funcionalmente activos en Bt para obtener las proteínas variantes Mod.

8.3.1 Promotor *Pcry3A*

La principal característica que distingue al promotor *Pcry3A* de otros promotores Cry es que el mecanismo de transcripción del gen *cry3A* es independiente de la esporulación, se activa entre el final de la fase exponencial de crecimiento vegetativo y la fase II de esporulación, y permanece activo hasta el estado IV (Juárez-Pérez, 2004; Schnepf *et al.*, 1998). Además este promotor es reconocido por el factor σ^A , el factor sigma de las células vegetativas que se activa al final del crecimiento vegetativo exponencial y se mantiene activo a través de la tercera fase de esporulación (Sanchis *et al.*, 1996). Este promotor cuenta también con una secuencia de estabilización *Shine-Dalgarno* que se denomina STAB-SD en la posición -125 y -117 en la región 5' no traducida, que brinda estabilidad a los RNA mensajeros (Agaisse y Lereclus, 1996).

En el año 1990 se reportó la fusión de la región regulatoria del gen *cry3A* con el gen *cry2Ab*; en la **figura 26** se observa el ensayo de Western blot contra la proteína Cry2Ab, se determinó que la toxina Cry2Ab se expresó eficientemente en las células de Bt y no así en *E. coli*, además la proteína resultó ser activa contra *Lymantria dispar*, *Heliothis virescens* y *T. ni* (Dankocsik *et al.*, 1990).



Figura 26. Western blot contra las proteínas sintetizadas en cepas *E. coli* y Bt incubadas con anticuerpos específicos contra Cry2Ab. Carriles: 1) *E. coli* (pEG220 Cry⁻), 2) *E. coli* (pEG230 Cry2Ab⁺), 3) *E. coli* (pEG267 Cry3A/Cry2Ab⁺), 4) Bt (pEG220 Cry⁻), 5) Bt (pEG243 Cry2Ab⁺), 6) Bt (pEG259 Cry3A/Cry2Ab⁺), 7) Bt (pEG2175 Cry2Ab) y 8) Bt HD-1 (Cry3A⁺/Cry2Ab⁺) (tomada de Dankocsik *et al.*, 1990).

8.3.1.1 Construcción del vector de expresión pHT315-*Pcry3A*-Kan-C730S y clonación de las variantes Mod

Con la finalidad de expresar las variantes Mod, se llevó a cabo el diseño y construcción de un vector de expresión bajo la regulación del promotor *Pcry3A*. A continuación se describen los elementos que lo conforman y que se presentan de manera esquemática en la **figura 27**:

Elemento	Descripción
1. pHT315	Como se mencionó anteriormente, este vector contiene un origen de replicación para <i>E. coli</i> , un origen de replicación para Bt, casete de resistencia al antibiótico eritromicina, casete de resistencia al antibiótico ampicilina, posee aproximadamente 15 ± 5 copias/cromosoma (Arantes y Lereclus, 1991).
2. Promotor <i>Pcry3A</i>	Es un promotor fuerte reconocido por el factor σ^A , se activa al final del crecimiento vegetativo exponencial y se mantiene activo hasta la tercera fase de esporulación (Sanchis <i>et al.</i> , 1996). Se ha reportado que este promotor permite la expresión de varios genes <i>cry</i> como: las toxinas Cry2Ab (Dankocsik <i>et al.</i> , 1990) y Cry1Ac (Chaoyin <i>et al.</i> 2007), además de una co-expresión de un fragmento de caderina (<i>hacad1</i>) y la proteína Cry1Ac (Peng <i>et al.</i> 2010); cabe destacar que en todos los casos las proteínas resultantes fueron funcionalmente tóxicas.
3. Casete de kanamicina	De manera similar al vector construido anteriormente, se insertó un casete de resistencia al antibiótico kanamicina, el cual se intercambió por los fragmentos N-terminal de cada construcción. El reemplazo de este casete permitió la selección negativa de las clonas con el inserto correcto.
4. Fragmento C-terminal con mutación puntual en el residuo C730S:	En un estudio previo se reportó la fusión de distintas versiones del promotor <i>Pcry3A</i> con el gen <i>cry1AcMod</i> obteniendo la expresión de las proteínas, sin embargo resultaron ser insolubles y no presentaron toxicidad (Martínez de Castro, 2013). De manera similar, la proteína Cry7Ba1 es insoluble en pH alcalino y no presenta toxicidad contra un rango de insectos. En el año 2011 el grupo del Dr. Peng reportó mediante un análisis de mutaciones puntuales en los residuos de cisteína localizados en el fragmento C-terminal que logró convertir a la proteína soluble y tóxica (Peng <i>et al.</i> , 2011). En este trabajo se identificaron dos residuos de cisteína que al cambiarlas de manera individual por serina permiten la correcta solubilización de la toxina Cry7Ba. La proteína Cry1Ac contiene un total de 16 cisteínas, 14 de ellas

se encuentran en la región C-terminal, la solubilidad de la proteína reside en la reducción de estos residuos (Du *et al.*, 1994). Por lo tanto, se insertó una mutación puntual en el fragmento C-terminal de Cry1Ac, específicamente en la cisteína 730 por serina con la finalidad de promover la solubilidad de las variantes Mod.

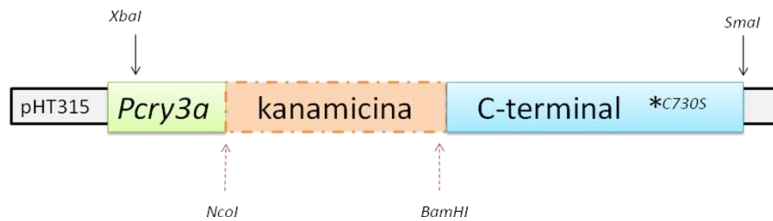


Figura 27. Representación esquemática del vector de expresión bajo la regulación del promotor *Pcry3A*.

En color verde se encuentra el promotor *Pcry3A* con los sitios de restricción *XbaI-NcoI*, en color anaranjado el casete de resistencia a kanamicina con los sitios *NcoI-BamHI* (fragmento a intercambiar por cada variante Mod) y en color azul claro el fragmento C-terminal de Cry1Ac con la mutación puntual C730S (indicada en asterisco) con los sitios *BamHI-SmaI*.

Para la obtención de vector de clonación-expresión, se realizó la amplificación por PCR de cada fragmento que lo conforma:

- a) Promotor *Pcry3A*: se utilizó como templado un lisado de la bacteria *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* que contiene el promotor nativo del gen *cry3A*, se amplificó con los oligonucleótidos específicos “P3A forward –P3A reverse”.
- b) Casete de kanamicina: se utilizó como templado el plásmido p3A-cry3A que contiene el gen de resistencia a *kanamicina* y se amplificó con los oligonucleótidos específicos “kanamicina forward- kanamicina reverse”.
- c) Fragmento C-terminal: se utilizó como templado el plásmido pHT3101 que contiene el fragmento C-terminal del gen *cry1Ac* (GenBank: M11068.1). Se utilizó el kit comercial “*QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit*” para lograr el cambio de la cisteína 730 por serina. Posteriormente se utilizó como templado para amplificar el fragmento C-terminal con los oligonucleótidos específicos P7Ale forward-P4Ale reverse.

Posteriormente cada fragmento que conformaría al vector, se clonó en el plásmido pJET 1.2 (Fermentas) de manera independiente y se corroboró su integridad mediante secuenciación. Cada plásmido se digirió con enzimas de restricción descritas en la **tabla 15**.

Tabla 15. Descripción de las enzimas de restricción y tamaño esperado.

Fragmento	Enzimas de restricción	Tamaño (en pb)
Inserto 1: Promotor <i>Pcry3A</i>	<i>XbaI-NcoI</i>	600
Inserto 2: Casete de kanamicina	<i>NcoI-BamHI</i>	1,500
Inserto 3: C-terminal C730S	<i>BamHI-SmaI</i>	2,069
Vector: pHT315	<i>HindIII-SmaI</i>	6,700

Se realizaron reacciones de ligación de los 3 insertos y el vector pHT315 en distintas proporciones y su integridad se confirmó por secuenciación de DNA. Posteriormente, se llevó a cabo la clonación de las variantes; como se mencionó anteriormente se inició con la clonación de las variantes Mod⁵¹VPG y Mod⁶⁹GPS. La construcción Cry1Ac silvestre bajo el promotor *Pcry3A* no se realizó ya que se encuentra reportada (Chaoyin *et al* 2007).

Finalmente, se realizó una doble digestión con las enzimas de restricción *NcoI* y *BamHI* (ambas de Fermentas) para escindir el casete de kanamicina del vector de expresión pHT315-Pcry3A-Kan-C730S y así integrar las variantes Mod mediante una

reacción de ligación. Estas ligaciones se transformaron en células competentes de *E. coli* DH5 α . Finalmente se corroboró la identidad de secuencia de los plásmido resultantes y se concluyó que se obtuvieron correctamente las construcciones de ambas variantes Mod.

8.3.1.2 Expresión de las variantes Mod en Bt

Los plásmidos pHT315-Pcry3A-⁵¹VPG-C730S y pHT315-Pcry3A-⁶⁹GPS-C730S se transformaron en células acristalíferas de Bt. Se analizó la producción de las proteínas en dos medios: LB y HCT, el primero de ellos se considera un medio rico y el segundo es un medio que favorece la esporulación de las bacterias. El resultado se encuentra en la **figura 28** y se puede observar que la variante ⁵¹VPG se expresa en ambos medios, sin embargo el rendimiento es significativamente menor respecto al control positivo de Cry1Ac silvestre. La variante ⁶⁹GPS no se expresó en ninguno de los medios analizados.

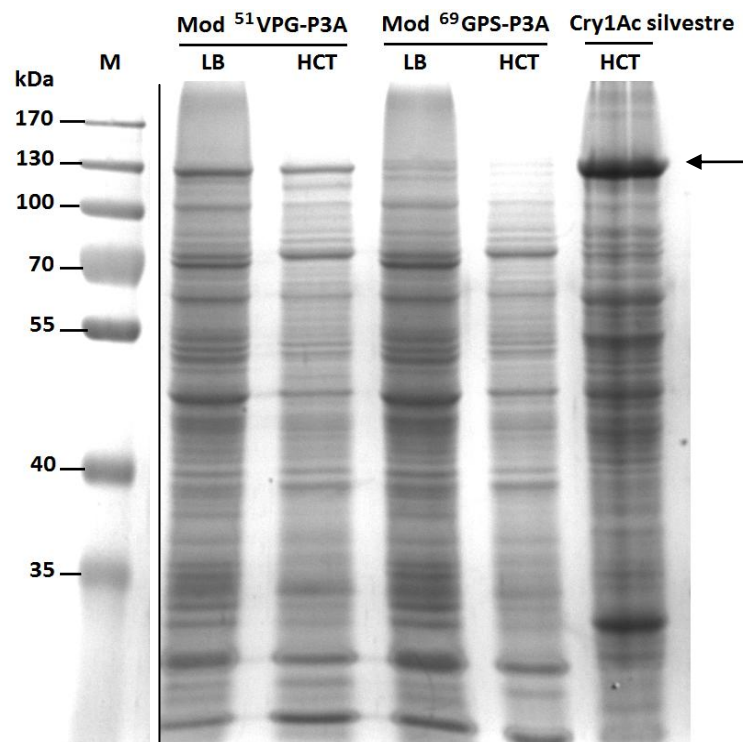


Figura 28. SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie. Proteína total de cultivos esporulados de Bt. Carriles: **1)** Marcador de peso molecular **2)** Mod ⁵¹VPG bajo el promotor *Pcry3A* crecido en medio LB, **3)** Mod ⁵¹VPG bajo el promotor *Pcry3A* crecido en medio HCT, **4)** Mod ⁶⁹GPS bajo el promotor *Pcry3A* crecido en medio LB, **5)** Mod ⁶⁹GPS bajo el promotor *Pcry3A* crecido en medio HCT, **6)** Control positivo: Cry1Ac silvestre crecido en medio HCT.

8.3.1.3 Solubilización de las variantes Mod en Bt

Se evaluó la solubilidad de cada proteína en un amortiguador de carbonatos 100 mM pH 10.5, 0.02% β -mercaptoetanol, que simula las condiciones que se encuentran presentes en el intestino de insectos lepidópteros. En la **figura 29** se observa el resultado de la solubilización, encontrando que la construcción Mod⁵¹VPG es muy poco soluble cuando se compara con el control positivo Cry1Ac silvestre, ya que la mayoría de la proteína se encuentra en el precipitado.

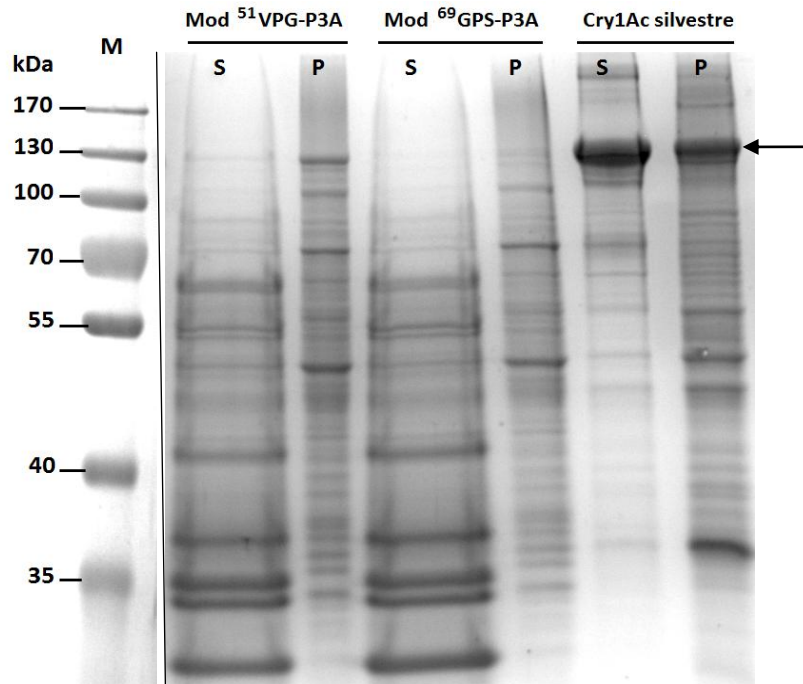


Figura 29. SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomassie. Solubilización de las proteínas bajo la regulación del promotor *PCry3A*. Carriles: **1)** Marcador de peso molecular **2)** Fracción soluble de Mod⁵¹VPG, **3)** Precipitado de Mod⁵¹VPG, **4)** Fracción soluble de Mod⁶⁹GPS, **5)** Precipitado de Mod⁶⁹GPS, **6)** Fracción soluble de Cry1Ac silvestre y **7)** Precipitado de Cry1Ac silvestre.

La solubilidad de las proteínas es el primer paso en el mecanismo de acción de las toxinas Cry y se ha observado que proteínas que no son solubles no presentan toxicidad (Aronson *et al.*, 1991). Por lo tanto, se concluye que esta estrategia no sería efectiva para expresar las demás variantes ya que se presume que el rendimiento de la proteína soluble es poco. Estudios recientes de la Dra. Blanca García muestran que mutaciones en otras cisteínas como C654S de la toxina Cry1AbMod resultan en proteínas con mayor solubilidad cuando se expresan en la cepa de Bti 4Q7, que la reportada en este trabajo, por lo que sería una alternativa para la generación de las variantes de las toxinas

Cry1AcMod conteniendo estos cambios en el fragmento C-terminal y expresando en esta cepa de Bt.

Es posible que el fondo genético de la cepa de Bt receptora también pudiera influenciar el plegamiento de la proteína para permitir o no su solubilización en ambientes alcalinos y reductores. Adicionalmente el trabajo de la MC. Francisca Villanueva mostró que una fusión de la toxina Cry1AbMod con el extremo C-terminal de la toxina Cry1C permite la correcta expresión de proteínas solubles cuando se expresan bajo el promotor *Pcry3A*, por lo que este tipo de construcciones también podrían ser viables para realizar la serie de variantes con diferentes deleciones en el extremos N-terminal de la toxina Cry1AcMod planteadas en este trabajo.

8.3.2 Promotor *PexsY*

El promotor *PexsY* dirige la transcripción del gen *exsY* bajo la regulación de factor σ^K ; se ha reportado que la proteína ExsY se requiere para la correcta formación del exosporio de *Bacillus anthracis* (Boydston *et al.*, 2006) y *Bacillus cereus* (Johnson *et al.* 2006). Como se mencionó en la Introducción, el factor σ^K es específico de la fase tardía de esporulación por lo que se pensó que este promotor no se expresaría en las células de *E. coli*. Este promotor fue fusionado con el gen *cry1Ac* y resultó ser funcional, ya que permitió la expresión correcta de la proteína en Bt y presenta actividad biológica (comunicación personal del Dr. Fuping Song), por lo tanto se utilizó como promotor candidato para la expresión de las variantes Mod. Sin embargo, cabe resaltar que el Dr. Song nos indicó que él no había analizado la expresión de este promotor en células de *E. coli*. Dado que este promotor depende del factor σ^K que es específico de esporulación y que *E. coli* no es una bacteria con capacidad esporulación se pensó que este promotor sería adecuado para la clonación de las variantes Mod.

8.3.2.1 Mutagénesis-delección

Para la generación de las variantes Mod se utilizó la técnica de PCR mutagénico-delección empleando como templado el DNA plasmídico pHT315-PesxY-Cry1Ac proporcionado por el Dr. Song, el cual contiene el promotor *PexsY* fusionado al gen *cry1Ac* silvestre en el vector pHT315. Se planteó la obtención de las siete variantes anteriormente mencionadas.

El resultado de la amplificación de cada construcción se clonó de manera independiente en células de *E. coli* DH5 α . Se obtuvieron pocas colonias, sin embargo se purificó el DNA plasmídico para verificar su secuencia; se encontró que ningún plásmido era correcto, es decir, de manera similar al resultado obtenido de la clonación de las

construcciones bajo el promotor P1P2, se encontraron defectos en la secuencia nucleotídica (**tabla 16**), por lo tanto se descartó continuar con esta estrategia.

Tabla 16. Resultado de la secuenciación del DNA perteneciente a las variantes Mod bajo el promotor *PexsY*

Construcción	Deleciones	Inserciones	Sustituciones
1. Clona 1 ³⁹ SLS	4	13	6
2. Clona 2 ³⁹ SLS	7	4	16
3. Clona 1 ⁴⁶ LLS	7	6	6
4. Clona 2 ⁴⁶ LLS	8	21	28
5. Clona 3 ⁴⁶ LLS	10	1	3
6. Clona 4 ⁴⁶ LLS	7	0	4
7. Clona 1 ⁵¹ VPG	5	2	23
8. Clona 1 ⁶⁹ GPS	6	14	91
9. Clona 2 ⁶⁹ GPS	9	3	5
10. Clona 1 ⁹³ RNQ	2	10	4

La similitud de la expresión de los promotores P1P2 y *PexsY* en *E. coli* podría deberse a que se encuentran secuencias con similitud a los consensos reconocidos por los factores σ de *E. coli*. Además el tiempo de la síntesis de la proteína ExsY en el desarrollo de la espora corresponde a la etapa IV de la esporulación, cuando la expresión es bajo el control del factor σ^K en la célula madre (Johnson *et al.* 2006).

8.4 Estrategia C: Clonación directa en Bt

La última estrategia consistió en la clonación directa en *Bacillus thuringiensis* 407 cry⁻, es decir, transformar directamente el resultado de la ligación de cada construcción en esta cepa. Esta estrategia evitaría el paso por *E. coli* para obtener DNA plasmídico y así evitar posibles rearreglos. Experimentalmente consta de tres pasos: el primero de ellos es la obtención de fragmentos, la ligación y finalmente la transformación en células acristalíferas de Bt. Esta estrategia ha sido utilizada anteriormente para la clonación de proteínas de Bt como la proteína S-layer, ya que esta proteína es tóxica para las células de *E. coli* (Peña *et al.*, 2006). Se requiere de un gran esfuerzo en tener una ligación exitosa que permita obtener colonias transformantes de Bt. El problema principal es que la transformación de Bt es poco eficiente.

Se digirieron los plásmidos: vector de expresión pHT315-P1P2-Kan con las enzimas *NcoI-BamHI* para remover el casete de kanamicina e insertar los fragmentos N-terminal de cada construcción, las cuales se digirieron igualmente con las enzimas *NcoI-BamHI*. Se corrieron geles semipreparativos para la obtención de las bandas correspondientes para proseguir con la ligación.

Debido a la baja eficiencia de transformación, se analizaron dos condiciones de ligación en relaciones molares 1:3 y 1:5 (vector: pasajero):

Tabla 17. Condiciones de ligación-A.

Reactivo	Construcción	Cry1Ac silvestre		Mod ⁵¹ VPG		Mod ⁶⁹ GPS	
		1:3	1:5	1:3	1:5	1:3	1:5
1. Vector (100 ng)		17.2 µL		17.2 µL		17.2 µL	
2. Inserto (depende)		4.8 µL	8 µL	3.7 µL	6.2 µL	3.5µL	5.8 µL
3. Ligasa T4		4 µL		4 µL		4 µL	
4. Buffer ligasa 10X		4 µL		4 µL		4 µL	
5. H ₂ O libre de nucleasas		10 µL	6.8 µL	11.1 µL	8.6 µL	11.3 µL	9 µL
	Volumen final	40 µL		40 µL		40 µL	

Cada ligación correspondiente a cada construcción se realizó por triplicado, es decir, se obtuvo un volumen total de 120 µL. La reacción se incubó a 16°C toda la noche, a la mañana siguiente se desactivó la enzima ligasa T4 a 65°C durante 10 minutos. Posteriormente los productos de la ligación se purificaron por columna y el volumen restante se transformó en células electrocompetentes de Bt. El resultado se muestra a continuación:

Tabla 18. Número de colonias resultantes de la transformación directa-A.

Construcción/plásmido	# de colonias
1. Cry1Ac silvestre (1:3)	0
2. Cry1Ac silvestre (1:5)	0
3. Mod ⁵¹ VPG (1:3)	0
4. Mod ⁵¹ VPG (1:5)	0
5. Mod ⁶⁹ GPS (1:3)	0
7. Mod ⁶⁹ GPS (1:5)	0
8. Control positivo: 5 µg de DNA plasmídico pHT3101.	11
9. Control negativo: H ₂ O libre de nucleasas	0

En general la eficiencia de transformación en bacterias Gram-positivas se considera bajo comparado con bacterias Gram-negativas (Trevors *et al.*, 1992); se tiene reportado que en *B. thuringiensis* se obtienen de 10^2 - 10^5 transformantes por µg de DNA plasmídico (Bone y Ellar 1989), en el control positivo fue la única condición en donde se encontraron colonias, el resultado se considera bajo comparado con lo mencionado anteriormente. Respecto a la transformación de las ligaciones, es importante mencionar que no se pudo cuantificar de manera precisa el número total de moléculas que se ligaron correctamente; debido a que no se encontraron colonias, se infiere que fue muy poco, por lo tanto se decidió analizar otra condición aumentando la cantidad de DNA en la ligación:

Tabla 19. Condiciones de ligación-B.

Reactivo	Cry1Ac silvestre		Mod ⁵¹ VPG		Mod ⁶⁹ GPS	
	1:3	1:5	1:3	1:5	1:3	1:5
1. Vector (100 ng)	3.9 µL		3.9 µL		3.9 µL	
2. Inserto (depende)	0.5 µL	0.9 µL	1.5 µL	2.5 µL	2 µL	3.3 µL
3. Ligasa T4	2 µL		2 µL		2 µL	
4. Buffer ligasa 10X	2 µL		2 µL		2 µL	
5. H ₂ O libre de nucleasas	11.6 µL	11.2 µL	10.6 µL	9.6 µL	10.1 µL	8.8 µL
Volumen final	20 µL		20 µL		20 µL	

En esta condición cada construcción se ligó de manera independiente con cuarenta repeticiones, es decir, juntos dan un volumen total de 800 µL. La reacción de ligación se incubó a 16°C toda la noche, a la mañana siguiente se desactivó la enzima ligasa T4 a 65°C durante 10 minutos. Posteriormente los productos de la ligación se purificaron y el volumen restante se transformó en células electrocompetentes de Bt, el resultado se muestra a continuación:

Tabla 20. Número de colonias resultantes de la transformación directa-B.

Construcción/plásmido	# de colonias
1. Cry1Ac silvestre (1:3)	0
2. Cry1Ac silvestre (1:5)	0
3. Mod ⁵¹ VPG (1:3)	0
4. Mod ⁵¹ VPG (1:5)	0
5. Mod ⁶⁹ GPS (1:3)	0
7. Mod ⁶⁹ GPS (1:5)	0
8. Control positivo: 5 µg de DNA plasmídico pHT3101.	14
9. Control negativo: H ₂ O libre de nucleasas	0

A pesar que se aumentó la cantidad de DNA en la ligación y se exploraron nuevamente las condiciones molares 1:3 y 1:5, no se encontraron colonias transformantes de las construcciones y permanece baja la eficiencia de transformación del control positivo. Existen diversos factores que afectan significativamente la eficiencia de transformación en Bt, de manera general se pueden enlistar tres aspectos:

- El primero de ellos es el método de obtención de células electrocompetentes, esto incluye la composición de amortiguadores en los cuales se suspende a las células y la temperatura. Se han realizado estudios comparativos que concluyen que la presencia de osmolitos tales como el sorbitol y manitol en la electroporación que incrementan significativamente la eficiencia de transformación en células Gram-positivas de *B. subtilis* y *B. licheniformis* (Xue *et al.*, 1999). Probablemente el protocolo que se utilizó no fue el óptimo, ya que no resultó ser eficiente en la transformación de las construcciones.
- El segundo aspecto que afecta la eficiencia de transformación son los parámetros del pulso eléctrico, ya que las paredes gruesas de las bacterias Gram-positivas hacen que las células sean menos vulnerables a los campos eléctricos o previenen la entrada de macromoléculas dentro de las células (Dower *et al.* 1992). Teniendo esto en cuenta se requeriría probar distintas condiciones de pulso eléctrico para la obtención de un mayor número de transformantes.
- Finalmente, se ha demostrado que la eficiencia de transformación está estrechamente relacionada con la fuente de DNA plasmídico, el método se optimiza cuando se transforma con DNA plasmídico no metilado (Macaluso y Mettus, 1991). Sin embargo, el mecanismo no se ha detallado hasta el momento, pero pudiera jugar un papel en la transformación de productos de ligación.

Los resultados reflejan la necesidad de la optimización de los protocolos de transformación de Bt que existen actualmente, que permitan obtener una alta eficiencia, abriendo el camino hacia la generación de nuevas proteínas con un menor número de inconvenientes como pudiera ser la necesidad de obtener DNA plasmídico de *E. coli*.

9. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron de manera exitosa dos vectores de expresión para las proteínas Cry; estos vectores podrán ser útiles para la clonación de diferentes mutantes o de nuevas toxinas Cry, ya que la contra selección con el antibiótico kanamicina permite seleccionar únicamente las clonas en donde se insertó correctamente el fragmento con la secuencia de las toxinas. En el vector pHT315-P1P2-Kan se obtuvo la correcta expresión de la proteína Cry1Ac silvestre en Bt.
- Las variantes ⁵¹VPG y ⁶⁹GPS bajo la regulación del promotor P1P2 presuntamente generan proteínas tóxicas en *E. coli* por lo cual se seleccionan rearrreglos que no expresan la proteína.
- El vector pHT315-Pcry3A-Kan-C730S resultó ser funcional para expresar la variante ⁵¹VPG, sin embargo se obtuvo una proteína con una solubilidad muy baja, lo que compromete su actividad insecticida.
- Las cepas de *E. coli* C41 (DE3) Y C43 (DE3) no fueron efectivas para clonar exitosamente ninguno los genes correspondientes a cada construcción, y por lo tanto no se obtuvieron las proteínas.
- El promotor *PexsY* presuntamente se expresa en *E. coli*, por lo que no se pudieron clonar exitosamente las variantes de Mod planteadas, ya que también se generan rearrreglos genéticos que impiden la correcta expresión de las toxinas.
- El método de transformación directa en Bt no fue lo suficientemente efectivo para generar colonias positivas por lo que requiere ser optimizado.

10. PERSPECTIVAS

- Probar otras cepas de *E. coli* que permitan el paso de genes tóxicos, como por ejemplo las células SURE (Aligent), que carecen de los genes involucrados en rearrreglos y deleciones de DNA: *mcrA-*, *mcrCB-*, *mcrF-*, *mrr-*, *hsdR* y *recB recJ*.
- Buscar promotores alternativos que no se expresen en *E. coli* pero que sí permitan la expresión en *Bacillus thuringiensis*, los cuales se podrían obtener de otras toxinas Cry diferentes a las utilizadas en este trabajo.
- Utilizar variantes de las toxinas Cry1A en el extremo C-terminal que permitan la solubilización de estas toxinas cuando se expresan bajo el promotor *Pcry3*, como las otras mutantes en residuo C654S o mutantes que contienen fusionado el C-terminal de Cry1C, las cuales han resultado en la producción de toxinas activas que muestran mayor solubilidad.
- Respecto a las células de *E. coli* C41 (DE3) y C43 (DE3), clonar los genes en el vector T7, bajo el promotor *lacUV5*, ya que este promotor se induce por medio de la adición del inductor IPTG y así se evitaría la expresión constitutiva y posibles rearrreglos del DNA.
- Optimizar el método de transformación por electroporación en *Bacillus thuringiensis*, probando otros amortiguadores con diferente composición y/o concentración de osmolitos, cambiando el pulso eléctrico y la recuperación de las células transformantes.

11. APÉNDICE

I. Medios de cultivo

Medio LB

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
Peptona	10.0
Extracto de levadura	5.0
NaCl	10.0

Disolver los componentes con agitación y aforar a 1L de medio con agua destilada. Para medio sólido agregar 15 g de agar.

Esterilizar en autoclave.

Medio BHI

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
Polvo de la infusión cerebro-corazón	37

Disolver componente con agitación y aforar a 1L de medio con agua destilada. Para medio sólido agregar 15 g de agar.

Esterilizar en autoclave.

Medio HCT

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
Triptona	2.5
Cas-aminoácidos	1.0

Disolver los componentes con agitación y aforar a 446 mL de medio con agua destilada.

Ajustar pH a 7.25 con KOH.

Para medio sólido agregar 7.5 g de agar.

Esterilizar en autoclave.

- Se preparan también las siguientes soluciones y se esterilizan en autoclave:

Solución I:

Componente gramos

KH_2PO_4 6.8

Disolver componente con agitación y aforar a 100 mL con agua destilada.

Solución II:

Componente gramos

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.23

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.017

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.14

Disolver componente con agitación y aforar a 100 mL con agua destilada.

Solución III:

Componente gramos

$\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2

H_2SO_4 (IN) 10.0 mL

Disolver componente con agitación y aforar a 100 mL con agua destilada.

Solución IV:

Componente gramos

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.47

Disolver componente con agitación y aforar a 100 mL con agua destilada.

Solución de glucosa al 10%

Componente gramos

Dextrosa 10.0

Disolver componente con agitación y aforar a 100 mL con agua destilada.

Al momento de utilizar el medio, a una temperatura soportable por el dorso de la mano, se adicionan las soluciones (previamente esterilizadas en autoclave):

Solución	mL
I	25.0
II	0.5
III	5.0
IV	5.0
Glucosa 10%	15.0

II. Buffers

TBE 10X

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
Tris	108.0
Ácido bórico	55.0
EDTA (0.5 M, pH 8)	40.0 mL

Disolver componentes con agitación y aforar a 1L con agua destilada.

Filtrar con filtro de 0.45 μ m

TAE 50X

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
Tris	242.0
Ácido acético glacial	57.1 mL
EDTA (0.5 M, pH 8)	100 mL

Disolver componentes con agitación y aforar a 1L con agua destilada.

Filtrar con filtro de 0.45 μ m

Buffer de corrida 10X (geles de acrilamida)

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
Glicina	144.0
Tris	30.0
SDS al 10%	10.0 mL

Disolver componentes con agitación y aforar a 1 L con agua destilada.

PBS 10X

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
NaH ₂ PO ₄	26.4
Na ₂ HPO ₄	47.2
NaCl	58.4

Disolver componentes con agitación, ajustar el pH a 7.2 con NaOH 5 M y aforar a 1 L con agua destilada.

Filtrar con un filtro de 0.45 µm.

Buffer EB (para preparar células de *Bt* electrocompetentes)

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
Sacarosa	64.2
MgCl ₂	0.1

Disolver componentes con agitación y aforar a 300 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave.

III. Otros materiales utilizados

Ampicilina (100 mg/mL)

En condiciones de esterilidad:

Disolver 1g de ampicilina en 10 mL de agua estéril.

Filtrar con un filtro de 0.22 µm.

Almacenar en congelación hasta su uso.

Eritromicina (10 mg/mL)

En condiciones de esterilidad:

Disolver 0.1 g de eritromicina en 5 mL de agua estéril con 5 mL de etanol absoluto.

Filtrar con un filtro de 0.22 μ m.

Almacenar en congelación hasta su uso.

Mezcla lítica 4X (10 mL)

<u>Componente</u>	<u>gramos</u>
Glicerol	4.0 mL
Tris (0.5 M, pH 6.8)	5.0 mL
SDS	0.4
2-mercapto etanol	1.0 mL

Adicionar azul de bromofenol con la punta de un palillo y mezclar.

Almacenar en congelación hasta su uso.

12. REFERENCIAS

A

- Agaisse H, Lereclus D. 1994. **Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* cryIIIA toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a *spo0A* mutant.** *J. Bacteriol.* 176: 4734–4741.
- Andow D, Hutchison W. 1998. **Bt-corn resistance management. Now or Never.** Union of Concerned Scientists, Cambridge. ed. M Mellon, J Rissler, pp. 19–66. Washington, DC: Union Concerned Sci.
- Angus T. 1954. **Studies of *Bacillus spp.* pathogenic for silkworm.** *Progress Report, Forest Biology Division, Canada Department of Science Service.* 9:6.
- Ali I, Luttrell G. 2007. **Susceptibility of boll-worm and tobacco budworm (Noctuidae) to Cry2Ab2 insecticidal protein.** *J. Econ. Entomol.* 100: 921-931.
- Atsumi S, Miyamoto K, Yamamoto K, Narukawa J, Kawai S, Sezutsu H, Kobayashi I, Uchino K, Tamura T, Mita K, Kadono-Okuda K, Wada S, Kanda K, Goldsmith MR, Noda H. 2012. **Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 109 (25): doi:10.1073/pnas.1120698109.
- Asai T, Sommer S, Bailone A, Kogoma T. 1993. **Homologous recombination-dependent initiation of DNA replication from DNA damage-inducible origins in *Escherichia coli*.** *The EMBO journal,* 12(8), 3287.
- Asano S, Yamashitaa C, Iizukaa T, Takeuchib K, Yamanakab S, Cerfc D, Yamamoto T. 2003. **A strain of *Bacillus thuringiensis subsp. galleriae* containing a novel cry8 gene highly toxic to *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae).** *Biological Control.* 28 (2): 191-196.
- Arantes O, Lereclus D. 1991. **Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*.** *Gene.* 108, 115–119.
- Aronson I, Han S, McGaughey W, Johnson D. 1991. **The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects.** *Applied and environmental microbiology,* 57(4), 981-986.
- Aronson I, Wu D, Zhang C. 1995. **Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene.** *J. Bacteriol.* 177 (14): 4059-4065.
- Aoki K, Chegāsaki Y. 1915. **Äoeber die pathogenität dersog. sotto Bacillen (Ishiwata) bei seidenrauen.** *Mitt Med Fak Kais.*13:419.

B

- Banci L, Bertini I, Ciurli S, Dikiy A, Dittmer J, Rosato A, Sciara G, Thompsett AR. 2002. **NMR solution structure, backbone mobility, and homology modeling of c-type cytochromes from gram-positive bacteria.** *Chembiochem.* 3(4):299-310.
- Baum A, Kakefuda M, Gawron-Burke C. 1996. **Engineering *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides with an indigenous site-specific recombination system.** *Applied and environmental microbiology,* 62(12), 4367-4373.
- Baxter W, Zhao Z, Gahan J, Shelton M, Tabashnik E, *et al.*, 2005. **Novel genetic basis of field-evolved resistance to Bt in *Plutella xylostella*.** *Insect Mol. Biol.* 14, 327–334.
- Baxter W, Zhao Z, Shelton M, Vogel H, Heckel G. 2008. **Genetic mapping of Bt-toxin binding proteins in a Cry1A-toxin resistant strain of diamondback moth *Plutella xylostella*.** *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 125–135.
- Bernard R, El Ghachi M, Mengin-Lecreux D, Chippaux M, Denizot F. 2005. **BcrC from *Bacillus subtilis* acts as an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase in bacitracin resistance.** *J Biol Chem.* 280(32):28852-7.
- Berliner E. 1911. **Äoeber die schlafsucht der mehlmotenraupe.** *Z Gesamte Getreidewes.* 3:63.
- Berliner E. 1915. **Über die Schlafsucht der Mehlmotenraupe (*Ephestia kuhniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis, n.sp.*** *Z angew Ent.* 2:29.
- Boonserm P, Mo M, Angsuthanasombat C, Lescar, J. 2006. **Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution.** *J Bacteriol.* 188: 3391.

- Boonserm P, Davis P, Ellar J, Li, J. 2005. **Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications.** *J.Mol.Biol.* 348: 363
- Bradford M. 1976. **Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Bichara M, Pinet I, Schumacher S, Fuchs RP. 2000. **Mechanisms of dinucleotide repeat instability in *Escherichia coli*.** *Genetics.* 154:533–542
- Bravo A, Gill S, Soberón M. 2007. **Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control.** *Toxicon.* 49: 423–435.
- Bravo A, Sarabia S, López L, Ontiveros H, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Lina L, Villalobos F, Peña G, Nuñez-Valdez M, Soberón M, Quintero R. 1998. **Characterization of cry Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection.** *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (12): 4965-4972.
- Bravo A, Soberón M. 2008. **How to cope with insect resistance to Bt toxins?.** *Trends in Biotechnology.* 26 (10): 573-579.
- Bravo A, Sánchez J, Kouskoura T, Crickmore N. 2002. **N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *B. thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin.** *J. Biol. Chem.,* 277 :23985–23987.
- Bone J, Ellar J. 1989. **Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation.** *FEMS Microbiol Lett.* 49 (2-3): 171-7.
- Bouhss A, Crouvoisier M, Blanot D, Mengin-Lecreux D. 2004. **Purification and characterization of the bacterial MraY translocase catalyzing the first membrane step of peptidoglycan biosynthesis.** *J. Biol. Chem.* 279(29):29974-29980.
- Boydston A, Yue L, Kearney F, Turnbough L. 2006. **The ExsY protein is required for complete formation of the exosporium of *Bacillus anthracis*.** *J. Bacteriol.* 188 (21): 7440-7448.
- Budisa N. 2005. **Engineering the Genetic Code: Expanding the amino acid repertoire for the design of novel proteins.** Cap. 4 Amino Acids and Codons- Code Organization and Protein Structure. Wiley. Germany. 83.
- Bulla L, Bechtel D, Kramer K, Shethna Y, Aronson A, *et al.* 1980. **Ultrastructure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*.** *Crit Rev Microbiol.* 8:147-204.
- Burns J, McIntosh J, Mink J, Jurek M, Li A. 2013. **Pesticide exposure and neurodevelopmental outcomes: Review of the epidemiologic and animal studies.** *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 16(3-4): 127–283.
- C**
- Chan H, Cheng K, Chan M. 2003. **Recombinant goldfish growth hormones (gfGH-I and -II) expressed in *Escherichia coli* have similar biological activities.** *Comp Biochem Physiol-Part A. Mol Integr Physiol.* 135(4):613-624.
- Chambers A, Jelen A, Gilbert P, Jany S, Johnson B, Gawron-Burke C. 1991. **Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*.** *J. Bacteriol.* 173 (13): 3966-3976.
- Chami M, Steinfels E, Orelle C, Jault JM, Di Pietro A, Rigaud JL, Marco S. 2002. **Three-dimensional structure by cryo-electron microscopy of YvcC, an homodimeric ATP-binding cassette transporter from *Bacillus subtilis*.** *J Mol Biol.* 315(5):1075-85.
- Chitkowski L, Turnipseed G, Sullivan J, Bridges C, 2003. **Field and laboratory evaluations of transgenic cottons expressing one or two *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* Berliner proteins for management of noctuid (Lepidoptera) pests.** *J. Econ. Entomol.* 96, 755–762.
- Connelly C, Leach R. 1996. **The sbcC and sbcD genes of *Escherichia coli* encode a nuclease involved in palindrome inviability and genetic recombination.** *Genes Cells.* 1996.1(3):285-91.
- Corchero L, Villaverde A. **Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins.** *Biotechnol Bioeng.* 1998;58:625–632.

Crickmore N, Zeigler R, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J. 1998. **Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 807-813.

D

Dawson H, Eddleston M, Senarathna L, Mohamed F, Gawarammana I, Bowe S, Manuweera G, Buckley N. 2010. **Acute human lethal toxicity of agricultural pesticides: a prospective cohort study.** *PLoS Med.* 7(10): e1000357.

Ding X, Luo Z, Xia L, Gao B, Sun Y, Zhang Y. 2008. **Improving the insecticidal activity by expression of a recombinant cry1Ac gene with chitinase-encoding gene in acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis*.** *Current microbiology*, 56(5), 442-446.

Douek J, Einav M, Zaristky A. 1996. **Sensitivity to plating of *Escherichia coli* cells expressing the cryA gene from *Bacillus thuringiensis* var, *israelensis*.** *Mol Gen Genet.* 232: 162-165.

Downes S, Parker T, Mahon R. 2010. **Incipient Resistance of *Helicoverpa punctigera* to the Cry2Ab Bt Toxin in Bollgard II® Cotton.** *PLoS ONE* 5(9): e12567. doi:10.1371/journal.pone.0012567.

Downes S, Mahon R. 2012. **Successes and challenges of managing resistance in *Helicoverpa armigera* to Bt cotton in Australia.** *GM Crops Food.* 3(3):228-34.

Dower J, Chassy M, Trevors T, Blaschek P. 1992. **Protocols for the transformation of bacteria by electroporation.** En: Chang, D.C., Chassy, B.M., Saunders, J.A., Sowers, A.E. (Eds.), *Guide to Electroporation and Electrofusion.* Academic by Press, San Diego, 485–499 pp.

Du C, Martin W, Nickerson W. 1994. **Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals.** *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3847-3853.

Du L, Qiu L, Peng Q, Lereclus D, Zhanga J, Songa F, Huang D. 2012. **Identification of the promoter in the intergenic region between *orf1* and *cry8Ea1* controlled by sigma H factor.** *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (12): 4164-4168.

Dhuria S, Gujar T. 2012. **Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India.** *Pest Manag Sci.* 67(8):898-903.

E

Elledge J, Walker C. 1983. **Proteins required for ultraviolet light and chemical mutagenesis: identification of the products of the *umuC* locus of *Escherichia coli*.** *Journal of molecular biology*, 164(2), 175-192.

Entwistle F, Cory S, Bailey J, Higgs S. 1993. ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice.** John Wiley & Sons, Chichester, UK.

Ertl F, Thomsen L. 2003. **Technical issues in construction of nucleic acid vaccines.** *Methods.* 31, 199–206.

Evans L, Clarkson J, Yudkin MD, Errington J, Feucht A. 2003. **Analysis of the interaction between the transcription factor *sG* and the anti-sigma factor *SpolIAB* of *Bacillus subtilis*.** *J Bacteriol.* 185: 4615–4619.

F

Farias R, Andow A, Horikoshi J, Sorgatto J, Fresia P, dos Santos AC, Omoto C. 2014. **Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil.** *Crop Protection.* 64: 150-158.

Ferré J, Van Rie J, 2002. **Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*.** *Annu. Rev. Entomol.* 47, 501-533.

Feucht A, Abbotts L, Errington J. 2002. **The cell differentiation protein *SpolIE* contains a regulatory site that controls its phosphatase activity in response to asymmetric septation.** *Mol Microbiol.* 45(4):1119-30.

G

Gahan J, Pauchet Y, Vogel H, Heckel G. 2010. **An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Toxin.** *PLoS Genet* 6(12): e1001248. doi:10.1371/journal.pgen.1001248.

- Galitsky N, Cody V, Wojtczak A, Ghosh D, Luft R, Pangborn W, English L. 2001. **Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis***. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 57: 1101-1109.
- Gassmann J, Petzold-Maxwell L, Keweshan S, Dunbar W. 2011. **Field-Evolved Resistance to Bt Maize by Western Corn Rootworm**. *PLoS ONE*. 6(7): e22629. doi:10.1371/journal.pone.0022629.
- Gassman J, Petzold-Maxwell L, Clifton H, Dunbar W, Hoffmann M, Ingber A, Keweshan S. 2014. **Field-evolved resistance by western corn rootworm to multiple *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic maize**. *PNAS*. 111 (14): 5141–5146.
- Gaytan, M. 2013. **Identificación y caracterización de los receptores de la toxina Cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* en *Manduca sexta***. Tesis de Maestría, UNAM. 90pp.
- Godiska R, Mead D, Dhodda V, Wu C, Hochstein R, Karsi A, Ravin N. 2009. **Linear plasmid vector for cloning of repetitive or unstable sequences in *Escherichia coli***. *Nucleic acids research*. doi: 10.1093/nar/gkp1181.
- Gómez I, Sánchez J, Miranda R, Bravo A, Soberón M, 2002b. **Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α 1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin**. *FEBS Lett*. 513, 242–246.
- Griffitts S, Aroian V, 2005. **Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins**. *Bioessays*. 27, 614–624.
- Grochulski P, Masson L, Borisova S, Pusztai-Carey M, Schwartz L, Brousseau R, Cygler M. 1995. ***Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation**. *J.Mol.Biol*. 254: 447-464.
- Gunning V, Dang T, Kemp C, Nicholson I, Moores D. 2005. **New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crop expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin**. *Appl. Environ. Microbiol*. 71, 2558–2563.
- Gunnell D, Eddleston M, Phillips R, Konradsen F. 2007. **The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: Systematic review**. *BMC Public Health*. 7: 357.
- Guo S, Ye S, Liu Y, Wei X, Wu H, Song F, Zhang J, Wu X, Huang D, Rao Z. 2009. **Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela***. *J.Struct.Biol*. 168: 259-266.
- H**
- Hannay L. 1953. **Crystalline inclusions in aerobic sporeforming bacteria**. *Nature*. 172: 1004.
- Hanahan, D. 1985. **DNA Cloning: A Practical Approach**. Glover, D. M. (ed.), Vol. 1, p. 109, IRL Press, McLean, Virginia.
- Horn C, Bremer E, Schmitt L. 2005. **Functional overexpression and in vitro re-association of OpuA, an osmotically regulated ABC-transport complex from *Bacillus subtilis***. *FEBS Lett*. Oct 6.
- Huang Z, Guan C, Guan X. 2004. **Cloning, characterization and expression of a new cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis* WB9**. *Biotechnol. Lett*. 26:1557-1561.
- Huang F, Ghimire N, Rogers L, Zhu C, Head P. 2012. **Susceptibility of field populations of sugarcane borer from non-Bt and Bt maize plants to five individual Cry toxins**. *Insect Science*. 19 (5): 570-578.
- Huang F, Andow A, Buschman L. 2011. **Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America**. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 140 (1): 1–16.
- Hui F, Scheib U, Hu Y, Sommer J, Aroian V, Ghosh, P. 2012. **Structure and glycolipid binding properties of the nematocidal protein Cry5B**. *Biochemistry*. 51: 9911-9921.
- I**
- Ito M, Hicks B, Henkin M, Guffanti A, Powers D, Zvi L, Uematsu K, Krulwich A. 2004. **MotPS is the stator-force generator for motility of alkaliphilic *Bacillus*, and its homologue is a second functional Mot in *Bacillus subtilis***. *Mol Microbiol*. 53(4):1035-1049.
- Ishiwata S. 1901. **On a kind of severe flacherie (sotto disease) (No. 1)**. *Dainihon Sanshi Kaiho*. 114, 1–5.
- Ishiwata S. 1905. **About “sotokin”, a bacillus of a disease of the silkworm**. *Dainihon Sanshi Kaiho*. 160, 1–8.

J

James C. 2013. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013**. ISAAA Brief No. 46. ISAAA: Ithaca, NY.

Jenkins L, Lee S, Sangadala J, Adang H, Dean D. 1999. **Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin to *Manduca sexta* aminopeptidase-N receptor is not directly related to toxicity**. *FEBS Lett.* 462:373-376.

Jiménez J, Muñoz-Garay C, Gómez I, Saab-Rincon G, Damian-Alamazo J. 2007. ***Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae**. *J. Biol. Chem.* 282, 21222-21229.

Johnson J, Todd J, Ball A, Shepherd M, Sylvestre P, Moir A. 2006. **ExsY and CotY are required for the correct assembly of the exosporium and spore coat of *Bacillus cereus***. *J Bacteriol.* 188(22): 7905–7913.

K

Kang K, Cox W. 1996. **Tandem repeats 30 of the IGHA genes in the human immunoglobulin heavy chain gene cluster**. *Genomics.* 35:189–195.

Kim K, Mulrooney B, Hausinger P. 2005. **Biosynthesis of active *Bacillus subtilis* urease in the absence of known urease accessory proteins**. *J Bacteriol.* 187(20):7150-4.

Kleter A, Bhula R, Bodnaruk K, Carazo E, Felsot S, Harris A. 2007. **Altered pesticide use on transgenic crops and the associated general impact from an environmental perspective**. *Pest Manag Sci.* 63:1107-15.

Kreiss, P. *et al.* 1999. **Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency**. *Nucleic Acids Res.* 27, 3792–3798.

Kruger M, Van Rensburg J, Van Den Berrg J. 2011. **Resistance to Bt Maize in *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) from Vaalharts, South Africa**. *Environmental Entomology.* 40(2):477-483. 2011.

Kurt A., Özkan M, Sezen K, Demirbağ Z, Özcengiz G. 2005. **Cry3Aa11: A new Cry3Aa δ -endotoxin from a local isolate of *Bacillus thuringiensis***. *Biotechnology letters.* 27(15), 1117-1121.

L

Lee K, Young A, Dean D. 1995. **Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216:306-312.

Lereclus D, Agaisse H, Grandvaletl C, Salamitou S, Gominet M. 2000. **Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis***. *Int. J. Med. Microbial.* 290, 295-299.

Li D, Carroll J, Ellar J. 1991. **Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution**. *Nature.* 353: 815-821.

Li G, Feng Y, Gao G, Wyckhuys K. 2010. **Frequency of Bt resistance alleles in *Helicoverpa armigera* in the Xinjiang cotton-planting region of China**. *Environ. Entomol.* 39: 1698–1704.

Lightwood J, Ellar J, Jarrett, P. 2000. **Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -Endotoxin**. *Applied and environmental microbiology.* 66(12):5174-5181.

Lin J, Sancar A. 1992. **Active site of (A)BC excinuclease. I. Evidence for 5' incision by UvrC through a catalytic site involving Asp399, Asp438, Asp466, and His538 residues**. *J. Biol. Chem.* 267:17688–17692.

Löwe J, Cordell C, van den Ent F. 2001. **Crystal structure of the SMC head domain: an ABC ATPase with 900 residues antiparallel coiled-coil inserted**. *J Mol Biol.* 306(1):25-35.

Lucet I, Borriss R, Yudkin D. 1999. **Purification, kinetic properties, and intracellular concentration of SpoIIE, an integral membrane protein that regulates sporulation in *Bacillus subtilis***. *J Bacteriol.* 181(10):3242-3245.

Lucet I, Feucht A, Yudkin D, Errington J. 2000. **Direct interaction between the cell division protein FtsZ and the cell differentiation protein SpoIIE**. *EMBO J.* 19(7):1467-75.

Luttrell G, Ali I. 2007. **Exploring selection for Bt resistance in Heliothines: results of laboratory and field studies**. Proceedings of the 2007 Beltwide Cotton Conferences, New Orleans, Louisiana, January 9–12, 2007, 1073–1086 (National Cotton Council of America, Memphis, Tennessee, USA, 2007).

M

- Macaluso A, Mettus M. 1991. **Efficient transformation of *Bacillus thuringiensis* requires nonmethylated plasmid DNA.** *Journal of bacteriology*, 173(3), 1353-1356.
- Masson L, Tabashnik B, Liu B, Brousseau R, Schwartz L. 1999. **Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin lines the lumen of the ion channel.** *Journal of Biological Chemistry*. 274: 31996-32000.
- Martinez de Castro, D. 2014. **Optimización de la toxina Cry1AcMod de *Bacillus thuringiensis* contra insectos Lepidópteros.** Tesis de Licenciatura, UNAM. 84pp.
- Miroux B, Walker E. 1996. **Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels.** *Journal of molecular biology*. 260(3), 289-298.
- Moran P. 1993. **RNA polymerase and transcription factors.** En: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R, eds., *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria Washington, DC: *American Society for Microbiology*. 653-67.
- Morse J, Yamamoto T, Stroud M. 2001. **Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope.** *Structure*. 9: 409-417.
- Müller H. 1949. **DDT and the newer insecticides**, London: Proceedings of the 2nd International Congress on Crop Protection.

O

- O'Brien J, Ellenberger T. 2003. **Human alkyladenine DNA glycosylase uses acid-base catalysis for selective excision of damaged purines.** *Biochemistry*. 42(42):12418-29.

P

- Pacheco S, Gómez I, Arenas I, Saab-Rincon G, Rodriguez-Almazan C, Gill SS, Bravo A, Soberón M. 2009. **Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a “ping-pong” binding mechanism with *Manduca sexta* aminopetidase-N and cadherin receptors.** *J Biol Chem*. 284: 32750–32757.
- Palmieri L, Palmieri F, Runswick MJ, Walker JE. 1996. **Identification by bacterial expression and functional reconstitution of the yeast genomic sequence encoding the mitochondrial dicarboxylate carrier protein.** *FEBS Lett*. 16;399(3):299-302.
- Parfenyev N, Salminen A, Halonen P, Hachimori A, Baykov A, Lahti R. 2001. **Quaternary structure and metal ion requirement of family II pyrophosphatases from *Bacillus subtilis*, *Streptococcus gordonii*, and *Streptococcus mutans*.** *J Biol Chem*. 276(27):24511-24518.
- Pardo-López L, Gómez I, Muñoz-Garay C, Jiménez-Juárez N, Soberón M, Bravo A. 2006. **Structural and functional analysis of the pre-pore and membrane-inserted pore of Cry1Ab toxin.** *J. Invertebr. Pathol*. 92(3):172-7.
- Peng R, Gallwitz D. 2002. **Sly1 protein bound to Golgi syntaxin Sed5p allows assembly and contributes to specificity of SNARE fusion complexes.** *J Cell Biol*. 157(4):645-55.
- Perez-García G, Basurto-Rios R, Ibarra E. 2010. **Potential effect of a putative sigma(H)-driven promoter on the over expression of the Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*.** *J. Invertebr. Pathol*. 104:140–146.
- Peña G, Miranda-Rios J, de la Riva G, Pardo-López L., Soberón M, Bravo A. 2006. **A *Bacillus thuringiensis* S-layer protein involved in toxicity against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae).** *Appl. Environm. Microbiol*. 72:353-360 ISSN 0099-2240 doi: 10.1128/AEM.72.1.353-360.2006.
- Poncet S, Dervyn E, Klier A, Rapoport G. 1997. **Spo0A represses transcription of the cry toxin genes in *Bacillus thuringiensis*.** *Microbiology*. 143, 2743–2751.

Q

- Qaim M, Zilberman D. 2003. **Yield effects of genetically modified crops in developing countries.** *Science*. 299:900-2.

R

- Rahman M., et al., 2004. **Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephesia kuehniella*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2696–2699.

- Rahaman A, Srinivasan N, Shamala N, Shaila MS. 2003. **The fusion core complex of the peste des petits ruminants virus is a six-helix bundle assembly.** *Biochemistry*. 42:922-931.
- Schimmele B, Grafe N, Pluckthun A. 2005. **Ribosome display of mammalian receptor domains.** *Protein Eng Des Sel*. 18(6):285-94.
- Rajamohan F, Lee M, Dean H. 1998. ***Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action.** *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 60:1-27.
- Razin V, Ioudinkova S, Trifonov N, Scherrer K. 2001. **Nonclonability correlates with genomic instability: a case study of a unique DNA region.** *J Mol Biol.* 307:481-486.
- Rivera-Torres O, Krueger-Koplin D, Hicks B, Cahill M, Krulwich A, Girvin E. 2004. **pKa of the essential Glu54 and backbone conformation for subunit c from the H⁺-coupled F1F0 ATP synthase from an alkaliphilic *Bacillus*.** *FEBS Lett.* 575:131-135.

S

- Sanchis V. 2011. **From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review.** *Agron. Sustain. Dev.* 31:217-231.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie, J, Lereclus D, Baum R, *et al.* 1998. ***Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins.** *Microbiol. Mol. Bio. Rev.* 62, 705-806.
- Searls T, Chen X, Allen S, Yudkin MD. 2004. **Evaluation of the kinetic properties of the sporulation protein SpoIIIE of *Bacillus subtilis* by inclusion in a model membrane.** *J Bacteriol.* 186(10):3195-201.
- Sekar, V. 1988. **The insecticidal crystal protein gene is expressed in vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis.** *Curr. Microbiol.* 17:347-349.
- Shizuya H, Birren B, Kim J, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M. 1992. **Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 89(18), 8794-8797.
- Soberón M, Pardo-López L., López I, Gómez I, Tabashnik B, *et al.*, 2007. **Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance.** *Science.* 318, 1640-1642.
- Sparks, T. 2013. **Insecticidal discovery: An evaluation and analysis.** *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 107: 8-17.
- Steinfels E, Orelle C, Dalmas O, Penin F, Miroux B, Di Pietro A, Jault JM. 2002. **Highly efficient over-production in *E. coli* of YvcC, a multidrug-like ATP-binding cassette transporter from *Bacillus subtilis*.** *Biochim Biophys Acta.* 1565(1):1-5.
- Storer P, Babcock M, Schlenz M, Meade T, Thompson D, Bing W, Huckaba M. 2010. **Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico.** *J. Econ. Entomol.* 103: 1031:1038.
- Storer P, Kubiszak E, King E, Thompson D, Santos C. 2012. **Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico.** *J. Invertebr. Pathol.* 110: 294:300.
- Sutera A, Han S, Rajman A, Lovett T. 1999. **Mutational analysis of the RecJ exonuclease of *Escherichia coli*: identification of phosphoesterase motifs.** *J Bacteriol.* 181(19):6098-102.

T

- Tabashnik B. 1994. **Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*.** *Annu. Rev. Entomol.* 39, 47-79.
- Tabashnik B, Carrière Y, Dennehy J, Morin S, Sisterson S, *et al.* 2003. **Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field.** *J. Econ. Entomol.* 96, 1031-1038.
- Tabashnik B, Gassmann J, Crowder W, Carrière Y. 2008. **Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory.** *Nat Biotechnol*, 26:199-202.
- Tabashnik B, Rensburg V, Carrière Y. 2009. **Field-Evolved Insect Resistance to Bt Crops: definition, theory, and data.** *J Econ Entomol.* 102(6):2011-25.
- Tabashnik B, Huang F, Ghimire N, Rogers B, Siegfried D, *et al.* 2011. **Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different mechanisms of resistance.** *Nat. Biotechnol.* 29: 1128-1131.

Tabashnik B, Brévault T, Carrière Y. 2013. **Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres.** *Nat. Biotechnol.* 31: 510:521.

Tabashnik B, Mota-Sanchez D, Whalon E, Hollingworth M, Carrière Y. 2014. **Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides.** *J Econ Entomol.* 107(2): 496-507.

Taylor G, Walker C, McInnes R. 1993. ***E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing.** *Nucleic Acids Res.* 21: 1677 -1678.

Tanaka S, Miyamoto K, Noda H, Jurat-Fuentes L, Yoshizawa Y, Endo H, Sato R. 2013. **The ATP-binding cassette transporter subfamily C member 2 in *Bombyx mori* larvae is a functional receptor for Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*.** *FEBS Journal*, 280: 1782–1794. doi: 10.1111/febs.12200.

Trevors T, Chassy M, Dower J, Blaschek P. 1992. **Electrotransformation of bacteria by plasmid DNA.** En: Chang, D.C., Chassy, B.M., Saunders, J.A., Sowers, A.E. (Eds.), *Guide to Electroporation and Electrofusion.* Academic Press, San Diego, 265–290 pp.

U

US EPA. 2001. **Bt plant pesticides risk and benefit assessments.** 2000 FIFRA SAP Rep. No. 200–7 <http://www.epa.gov/scipoly/sap/2000/october/octoberfinal.pdf>

V

Vachon V, Prèfontaine G, Rang C, Coux F, Juteau M, Schwartz L, Brousseau R, Frutos R, Laprade R, Masson L. 2004. **Helix 4 Mutants of the *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Toxin Cry1Aa Display Altered Pore-Forming Abilities.** *Appl. Environ. Microbiol. October.* 70 (10): 6123-6130.

van den Ent F, Löwe, J. 2005. **Crystal structure of the ubiquitin-like protein YukD from *Bacillus subtilis*.** *FEBS Letters.* 579(17):3837-3841.

van Sluis A, Moolenaar F, Backendorf C. 1983. **Regulation of the *uvrC* gene of *Escherichia coli* K12: localization and characterization of a damage-inducible promoter.** *The EMBO journal*, 2(12), 2313.

Van Rensburg J. 2007. **First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize.** *S. Afr. J. Plant Soil.* 24: 147-151.

Verhoeven A, van Kesteren M, Moolenaar F, Visse R, Goosen N. 2000. **Catalytic sites for 3' and 5' incision of *Escherichia coli* nucleotide excision repair are both located in UvrC.** *J. Biol. Chem.* 275:5120–5123.

W

Wan P, Huang Y, Wu H, Huang M, Cong S, Tabashnik BE, Wu K. 2012. **Increased Frequency of Pink Bollworm Resistance to Bt Toxin Cry1Ac in China.** *PLoS ONE.* 7(1): e29975. doi:10.1371/journal.pone.0029975.

Widner R, Whiteley R. 1989. **Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities.** *J. Bacteriol.* 171, 965–974.

Woodgate R, Rajagopalan M, Lu C, Echols H. 1989. **UmuC mutagenesis protein of *Escherichia coli*: purification and interaction with UmuD and UmuD'.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86(19): 7301–7305.

Wong C, Schnepf E, Whiteley R. 1983. **Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene.** *J Biol Chem.* 258:1960-7.

X

Xue P, Johnson S, Dalrymple P. 1999. **High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*.** *Journal of Microbiological Methods.* 34(3): 183–191.

Y

Yamaguchi H, Hanada K, Asami Y, Kato I, Ikeda H. 2000. **Control of genetic stability in *Escherichia coli*: the SbcB 3'-5' exonuclease suppresses illegitimate recombination promoted by the RecE 5'-3' exonuclease.** *Genes to Cells*, 5(2), 101-109.

Z

Zhao Z, Cao J, Collins L, Bates L, Roush T, *et al.* 2005. **Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two *Bacillus thuringiensis* genes speeds insect adaptation to pyramided plants.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8426–8430.

- Zhang J, Schairer U, Schnetter W, Lereclus D, Agaisse H. 1998. ***Bacillus popilliae cry18Aa* operon is transcribed by sigmaE and sigmaK forms of RNA polymerase from a single initiation site.** *Nucl. Acids Res.* 1998, 26, 1288–1293.
- Zhang X, Candas M, Griko B, Taussig R, Lee A, Bulla A. 2006. **A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9897–9902.
- Zhang H, Yin W, Zhao J, Jin L, Yang Y, Wu S, Tabashnik BE, Wu Y. 2011. **Early Warning of cotton bollworm resistance associated with intensive planting of Bt cotton in China.** *PLoS ONE.* 6(8): e22874. doi:10.1371/journal.pone.0022874.
- Zhang H, Tian W, Zhao J, Jin L, Yang J, Liu C, Yang Y, Wu S, Wu K, Cui J, Tabashnik B, Wu Y. 2012a. **Diverse genetic basis of field-evolved resistance to Bt cotton in cotton bollworm from China.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26;109(26):10275-80.
- Zhang X, Tiewisiri K, Kain W, Huang L, Wang P. 2012b. **Resistance of *Trichoplusia ni* to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac is independent of alteration of the cadherin-like receptor for Cry toxins.** *PLoS ONE.* 7(5): e35991. doi:10.1371/journal.pone.0035991.
- Zhang L, Huang F, Rogers L, Chen M, Clark T, Zhu YC, Wangila DS, Yang F, Niu Y. 2013. **Susceptibility of Cry1Ab maize-resistant and -susceptible strains of sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to four individual Cry proteins.** *Journal of Invertebrate Pathology.* 112 (3): 267
- Zhou C, Peng Q, Du L, Shu C, Zhang J, Song F. 2014. **Screening of cry-type promoters with strong activity and application in Cry protein encapsulation in a sigK mutant.** *Applied Microbiology and Biotechnology.* 98(18):7901-9.