



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Identificación del receptor para la toxina Cry11Aa de
Bacillus thuringiensis subespecie *israelensis* presente sobre las
células intestinales de larvas de *Aedes aegypti*. Estudio
molecular de los epítopes involucrados en la interacción
toxina-receptor**

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A
M. en C. LUISA ELENA FERNÁNDEZ ALTUNA

DIRECTOR DE TESIS
DR. MARIO SOBERÓN CHÁVEZ

CUERNAVACA, MOR.

SEPTIEMBRE

2006



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.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi hijo, Samuel Dago Fernández, por ser el motivo que me impulsa a ser cada día mejor persona. Quiero que sepas que eres el mejor regalo que me ha dado la vida. TE ADORO.

A mi esposo, Angel Dago Rodríguez, por ir conmigo de la mano cada día, ayudarme a superar los peores momentos y acompañarme a compartir los buenos. Eres un hombre maravilloso y un padre sin igual. Por todo tu amor y dedicación....TE AMO.

A mis padres, por regalarme la vida. Especialmente, a mi papá quien me ha transmitido valores y me ha ayudado a darle importancia a las cosas que realmente las merecen. Por servirme de ejemplo, GRACIAS.

A mi hermana, a quien espero servir de inspiración para lograr cosas grandes. Mari, deseo alcances todos tus sueños. TE QUIERO MUCHO.

A mi abuelita Elena, por brindarme el nido de amor y ternura de su corazón cuando la vida me jugó sus peores jugadas. Abue, aunque ya no estés a mi lado, siempre te tendré presente en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar esta lista agradeciendo especialmente a mi tutor, el Dr. Mario Soberón Chávez, por todo el apoyo académico que me ha brindado durante los años en los que he realizado mi doctorado. Además le debo otro agradecimiento, no menos especial, a la Dra. Ale Bravo por todos sus aportes y críticas constructivas respecto al proyecto. A ambos, les agradezco mucho por su amistad, su confianza y todo su apoyo en el plano personal.

A los Drs. Joel Osuna y Mario H. Rodríguez por todo el tiempo dedicado a mi formación en su papel de tutores auxiliares. Por tantas críticas y sugerencias y, no menos, horas de charla para mejorar mi trabajo. Quiero que sepan que su ayuda ha sido vital para hacer mi trabajo mejor cada día.

Al Dr. Sarjeet S. Gill, por ofrecerme su hospitalidad y poner a mi disposición la infraestructura necesaria para realizar las inmunolocalizaciones. Además, a la Dra. Karlygash Aimanova por dedicarme su tiempo y con paciencia y profesionalidad transmitirme sus conocimientos de inmunocitoquímica. A ambos quiero decirle que los tres meses que trabajamos juntos fueron de suma importancia para mi preparación y el enriquecimiento de este trabajo.

A mis sinodales los Drs. Lorenzo Segovia, Jordi Folch, Humberto Lanz, Ernesto Ortiz, Ricardo Grande y Edmundo Calva, por abrir un tiempo en su apretada agenda y dedicarse con seriedad a la revisión de mi tesis.

A la Dra. Gloria Saab Rincón, por participar en mi examen tutorial ampliado y aportar críticas valiosas al trabajo. Le agradezco, aun cuando las circunstancias no le permitan participar en la revisión del manuscrito y el examen de grado.

A mis compañeros de laboratorio: Oswaldo, Iván, Teresa, Sabino, Erandi, Nancy, Juan, Isabel, Angeles, Claudia, Jorge, Liliana, Christopher, Logoi, Roberto, Leivi, Carlos, Nuria y Liz. A la mayoría por su compañerismo, amistad y buenos momentos juntos a los otros por enseñarme que la vida no siempre es rosa; lo cual me permite valorar más a las personas que me quieren.

A Claudia le dedico uno especial por compartir conmigo sus conocimientos, su cariño y tantos y tantos protocolos. Por las buenas horas de trabajo juntas, mil gracias.

A Lili por ser más que compañera mi AMIGA. Ya sabes, te deseo todo lo que se le desea a los que se les quiere bien.

Otro especial a Liz por engordar con tanto afán a las larvitas que son el principio básico de este trabajo. Por tu apoyo en lo personal, mis más sinceros agradecimientos.

A Chelita por tu buen humor a pesar de la nube de papeles. Gracias por tu ayuda administrativa, eres una secre como pocas.

A Checo, por estar siempre dispuesto a ayudar sin que se te borre la sonrisa.

A Alejandro, por mantener nuestra segunda casa reluciente.

A las unidades de servicios del instituto y todos los que en ellas laboran.

A la UNAM, por darme la posibilidad de formarme como investigadora y acogerme como una hija más y a la DGEF por ayudarme con los frijoles y el techo.

A México, porque aquí he vivido los mejores años de mi vida y he podido aspirar a ser mejor como profesional y he logrado ser una persona libre.

A mi esposo Angel, por acompañarme en esta carrera titánica con su hombro siempre dispuesto, y sonreír a pesar de los pesares. Por hacerme sentir que mi existencia diaria es un evento feliz.

A mis amigos más queridos: Paty y Sergio, por compartir con nosotros todos los momentos especiales de los últimos años, como suelen hacer los familiares mas queridos.

A mi familia, en especial a mis padres a quien debo mi vida y mis principios. A todos les agradezco todo el amor y los buenos momentos que hemos compartido a lo largo de mi existencia. A mi abuelita Elena por ser, para mí un ejemplo de dedicación en todos los aspectos. Por todo tu amor incondicional para conmigo y por estar junto a mí en los peores momentos. Incluyo a mi familia política, la cual me ha acogido en su seno y me ha hecho sentir que son una extensión de mi propia familia. En especial a mi suegra a quien quiero como una madre.

A todos los que se me puedan olvidar hoy y que merezcan mis agradecimientos

A todos,

MUCHAS GRACIAS

**Este trabajo se realizó en el Departamento de
Microbiología Molecular del Instituto de
Biotecnología de la UNAM, basado en una idea
original y bajo la dirección del Dr. Mario Soberón
Chávez**

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
Capítulo 1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
1.1 Características generales	7
1.2 Bt y su relación con otras bacterias del género <i>Bacillus</i>	8
1.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> subespecie <i>israelensis</i> (Bti)	9
Capítulo 2. δ-endotoxinas producidas por <i>Bacillus thuringiensis</i>	11
2.1 Características generales	11
2.2 Clasificación de las toxinas Cry	11
2.3 Estructura tridimensional de las toxinas Cry y Cyt de <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
Capítulo 3. Mecanismo de acción de las toxinas Cry	16
3.1 Mecanismo de acción general	16
3.2 Solubilización	17
3.3 Activación	17
3.4 Unión al receptor	19
3.5 Inserción en membranas	22
3.6 Oligomerización y formación de poro	23
Capítulo 4. Moléculas receptoras para toxinas Cry	24
4.1 Proteínas tipo caderinas	24
4.2 Receptores anclados por GPI	25
Capítulo 5. Otras toxinas producidas por <i>Bacillus thuringiensis</i>	27
5.1 Toxinas VIP	27
Capítulo 6. Toxina binaria (BinA/BinB) de <i>Bacillus sphaericus</i>	28
Capítulo 7. Despliegue en fagos	30
Capítulo 8. Teoría del reconocimiento molecular	31
OBJETIVOS	33

APÉNDICE I. Contribución original. Cry11Aa toxin from <i>Bacillus thuringiensis</i> binds its receptor in <i>Aedes aegypti</i> mosquito larvae through loop $\alpha 8$ of domain II. <i>FEBS Letters</i> . 2005. 579, 3508-3514 _____	35
Discusión y conclusiones del apéndice I _____	36
APÉNDICE II. Contribución original. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in <i>Aedes aegypti</i> larvae. <i>Biochemical Journal</i> . 2006. 394, 77-84 _____	40
Discusión y conclusiones del apéndice II _____	41
APÉNDICE III. Artículo en colaboración. <i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>israelensis</i> Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. <i>PNAS</i> . 2005. 102, 18303-18308 _____	45
Discusión y conclusiones del apéndice III _____	46
APÉNDICE IV. Otras contribuciones. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by <i>Bacillus thuringiensis</i> . Revisión aceptada en la revista <i>Peptides</i> . 2006 _____	49
APÉNDICE V. Otras contribuciones. Characterization of monoclonal anti- β_2 -glycoprotein-I and anti-prothrombin antibody fragments generated by phage display from a patient with primary antiphospholipid syndrome. 2006. <i>Journal of Autoimmunity</i> 26, 57-65 _____	50
CONCLUSIONES GENERALES _____	51
PERPECTIVAS GENERALES _____	55
Resultados preliminares _____	55
<i>Análisis de secuencia de la ALP de Aedes aegypti</i> _____	55
<i>Análisis de los perfiles de hidropatía</i> _____	56
Propuestas para la continuación del trabajo _____	56
REFERENCIAS _____	58

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis subs *israelensis* (Bti) produces Cry and Cyt toxins active against mosquitoes. In the general mode of action of the three domains Cry toxins, the binding to the receptor is a key determinant of specificity. Specially, the loop regions on domain II are involved in toxin-receptor interaction in lepidopteran insects. However, mosquitocidal Cry toxins have been not fully characterized. In order to determine the regions of the mosquitocidal Cry11Aa toxin involved in the toxin-receptor interaction, synthetic peptides corresponding to putative exposed regions on the domain II of Cry11Aa were synthesized and their ability to compete the binding of the toxin to *Aedes aegypti* larvae brush border membrane (BBMV) was determined by a competition binding assay. We found that two putative exposed loops ($\alpha 8$ and loop 3) and a putative exposed region ($\beta 4a-\beta 4b$) of the domain two of Cry11Aa are important epitopes involved in receptor interaction. The role of loop $\alpha 8$ of Cry11Aa in receptor interaction was demonstrated by phage display and site-directed mutagenesis. We isolated a peptide-displaying phage (P5.tox) that recognizes Cry11Aa and interferes the binding of this toxin to BBMV receptors. This phage attenuates the toxicity of Cry11Aa around 50% in bioassays performed with fourth instar larvae of *A. aegypti*. Furthermore, we characterized Cry11Aa-loop $\alpha 8$ mutants (E266A, V262A and P261A) affected in toxicity and receptor binding.

On the other hand, a 65 kDa GPI-anchored alkaline phosphatase (GPI-ALP) was identified and characterized as a functional receptor of Bti Cry11Aa toxin in the midgut of *A. aegypti* larvae. Two GPI-anchored proteins of 65 and 100 kDa were preferentially extracted after treatment of BBMV obtained from *A. aegypti* larvae midgut with phospholipase C and a 65 kDa protein, with ALP activity, was further purified by toxin affinity chromatography. Using two peptide-phages (P1.BBMV and P8.BBMV) that interact with 65 kDa GPI-ALP and affect the binding of Cry11Aa to BBMV, we observed that a 65 kDa GPI-ALP was, preferentially, distributed in caeca and posterior part of the *A. aegypti* larvae midgut. Cry11Aa toxin binds to the same region of the midgut of P1.BBMV and P8.BBMV phages, furthermore the binding of the toxin and the P1.BBMV phage was competed by loop $\alpha 8$ synthetic peptide. The importance of this interaction was demonstrated by the *in vivo* attenuation of

Cry11Aa toxicity in the presence of P1.BBMV and P8.BBMV phages and loop α 8 synthetic peptide.

Taking all our results together, we demonstrated that loop α 8 is an important epitope involved in the interaction of Cry11Aa toxin with the natural GPI-ALP receptor displayed on *A. aegypti* larvae midgut cells.

RESUMEN

Bacillus thuringiensis subs *israelensis* (Bti) produce toxinas Cry y Cyt activas contra mosquitos. En el mecanismo de acción general de las toxinas Cry de tres dominios, la unión al receptor es el factor clave para determinar la especificidad. Fundamentalmente, se ha descrito que las regiones lazo del dominio II de dichas toxinas están involucradas en la interacción toxina-receptor. Con el objetivo de determinar la participación de las regiones expuestas del dominio II de la toxina Cry11Aa en la interacción con vesículas de membrana de microvellosidad apical (VMMA), obtenidas a partir de larvas de *Aedes aegypti*, se construyeron péptidos sintéticos correspondientes a dichas regiones. La capacidad de dichos péptidos para competir la interacción toxina-VMMA fue determinada empleando ensayos de competencia de la unión. Nosotros encontramos que los péptidos correspondientes a las regiones lazo $\alpha 8$ y 3 y a la región expuesta $\beta 4a-\beta 4b$, afectan de modo negativo la unión. El papel del lazo $\alpha 8$ de Cry11Aa en la interacción con el receptor fue determinado empleando las técnicas de despliegue en fagos y mutagénesis sitio dirigida. Como resultado obtuvimos un fago-péptido (P5.tox) que interactúa con Cry11Aa y afecta la unión de la toxina a las VMMA. La presencia de este fago-péptido provoca una disminución de aproximadamente un 50% en la toxicidad de Cry11Aa en bioensayos realizados con larvas de *A. aegypti* de cuarto instar de desarrollo. Se comprobó además, que las mutantes en el lazo $\alpha 8$ de la toxina Cry11Aa están afectadas en unión y toxicidad.

Por otra parte, una fosfatasa alcalina (ALP) anclada a membrana por un puente de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) fue identificada y caracterizada como el receptor funcional para la toxina Cry11Aa de Bti en células del epitelio intestinal de larvas de *A. aegypti*. Dos proteínas de 65 y 100 kDa fueron, principalmente, extraídas de las VMA después del tratamiento de las mismas con fosfolipasa C y la proteína de 65 kDa, con actividad de ALP, fue purificada a través de cromatografía de afinidad. Con el empleo de dos fago-péptidos (P1.BBMV y P8.BBMV) que interactúan con la ALP e inhiben la interacción de la toxina con las VMA, nosotros observamos que la ALP se distribuye en el intestino de larvas de *A. aegypti* del mismo modo que la toxina Cry11Aa (en la caeca y la región posterior del intestino). La unión de la toxina

Cry11Aa al intestino y su toxicidad hacia larvas de *A. aegypti*, fueron competidas por ambos fagos y el péptido sintético correspondiente al lazo $\alpha 8$.

Los resultados obtenidos demuestran, que el lazo $\alpha 8$ del dominio II de la toxina Cry11Aa es una región importante involucrada en la interacción de la toxina con su receptor funcional (ALP) desplegado sobre las células intestinales de larvas de *A. aegypti*. Este constituye el primer reporte donde se identifica un receptor para toxinas Cry con actividad contra insectos dípteros.

INTRODUCCIÓN

Una de las principales preocupaciones, a nivel mundial, es el control de insectos que constituyen plagas agrícolas y vectores de enfermedades. Las estadísticas muestran que alrededor del 30% de los cultivos agrícolas se pierden en campo o durante su almacenamiento debido a la presencia de insectos plagas. Además, muchas enfermedades como la malaria y el dengue, las cuales son transmitidas por mosquitos, cobran cada año la vida de decenas de miles de personas, fundamentalmente niños (Revisado en Porter *et al.*, 1993).

Hasta el momento, el control de este tipo de insectos está basado en el empleo indiscriminado de insecticidas químicos, lo que ha provocado que se generen un sin número de efectos adversos a nivel ambiental y de salud pública. Desde el punto de vista ambiental el uso de pesticidas químicos ha contribuido en gran medida a la contaminación del agua, así como la alteración del equilibrio ecológico por destrucción de múltiples organismos. Además ha conducido al surgimiento de plagas agrícolas y vectores de enfermedades resistentes.

Por otra parte, existe un gran número de reportes que vinculan el uso de pesticidas químicos empleados en el control de plagas agrícolas y vectores de enfermedades con la incidencia de diferentes tipos de cáncer. Especialmente, el empleo de compuestos químicos órganofosforados, usualmente empleados en el control de mosquitos, ha sido registrado dentro de los agentes etiológicos del cáncer de mama (Cabello *et al.*, 2003). Todas estas consecuencias nocivas, han conducido a muchos investigadores a la búsqueda de formas alternativas para combatir este tipo de insectos.

Desde hace varias décadas, se ha venido estudiando el potencial de bacterias entomopatógenas en el control de insectos que constituyen plagas agrícolas y vectores de enfermedades. Años de estudio y prácticas en campo han demostrado que los biopesticidas constituyen una alternativa potencial al empleo de insecticidas químicos; ya que no constituyen un riesgo ecológico al ser biodegradables y altamente específicos hacia sus insectos blanco. A pesar de esto, el bajo costo de producción, la fácil aplicación y el amplio espectro de acción de los químicos; le han permitido dominar el mercado del control de plagas donde los bioinsecticidas ocupan menos del 5%. No

obstante, los biopesticidas son empleados cada año en algunos millones de hectáreas de cultivos y en estos casos ofrecen un control seguro desde el punto de vista ambiental.

Para el control de plagas con biopesticidas son empleados diversos tipos de virus, hongos y bacterias. En todos los casos se tratan de organismos que afectan a su insecto blanco con una alta especificidad. Sin embargo, el hecho de que los biopesticidas sean altamente específicos contra especies determinadas puede resultar paradójico. Por una parte, se evita que los mismos afecten a insectos benéficos y otros organismos superiores; pero en el caso de cultivos afectados por diferentes plagas puede resultar contraproducente.

Además, los costos de producción de estos productos son elevados y su características de ser compuestos biodegradables obliga a que se deban aplicar frecuentemente. Es por ello, que los ingenieros genéticos se han volcado a la búsqueda de soluciones a las limitaciones de este tipo de productos, con el objetivo de encontrar variantes cada vez más baratas y con mayor estabilidad y rango de acción.

Hasta la fecha, las bacterias que constituyen patógenos contra este tipo de insectos han sido las más empleadas y entre ellas *Bacillus thuringiensis* constituye el agente biológico mayormente utilizado a nivel mundial.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Capítulo 1. *Bacillus thuringiensis*

1.1 Características generales

Bacillus thuringiensis (Bt) fue descrita por vez primera como una plaga que mataba de forma repentina al gusano de la seda (*Bombyx mori*) en Japón. La bacteria fue aislada a partir de los cadáveres de dichos insectos y por tanto fue considerada como una plaga. Diez años más tarde, una cepa con características similares fue encontrada en larvas de *Anagasta kuhniella* y a partir de entonces la bacteria asumió su nombre actual.

Bt es una bacteria gram-positiva, aerobia estricta y formadora de esporas, que durante la fase estacionaria de su crecimiento forma inclusiones cristalinas. Esta bacteria es encontrada en una amplia variedad de nichos que incluyen suelos, superficies de plantas, productos de desecho almacenados y esqueletos de insectos. Hasta el momento su papel ecológico permanece bajo debate, pero se ha propuesto que se especializó en matar insectos como una estrategia para poder acceder a un medio rico en nutrientes. Esta hipótesis se basa en el hecho de que su crecimiento en medios con mínimos suplementos de glucosa y nitrógeno es muy pobre. Está incluida junto con *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* y *Bacillus mycoides* en el grupo de *Bacillus cereus* y la característica que la distingue de los otros miembros del grupo es su capacidad enteropatógena.

Hasta el momento se han identificado cientos de cepas diferentes de Bt, cada una de las cuales posee un rango limitado de hospederos muy limitado. Sin embargo todas juntas son letales a un amplio rango de órdenes de insectos tales como Lepidópteros, Coleópteros, Dípteros, Himenópteros, Homópteros, Ortópteros y Malófagos (Beegle and Yamamoto, 1992) y organismos tales como Nemátodos, Mitos y Protozoos (Feitelson *et al.*, 1992).

El factor fundamental que determina la toxicidad de Bt a un amplio rango de insectos, es la presencia de proteínas insecticidas (δ -endotoxinas) contenidas en las inclusiones cristalinas parasporales. Sin embargo, en algunos casos se ha demostrado la participación de proteínas producidas en la fase vegetativa del crecimiento bacteriano (β -exotoxinas y toxinas VIP) y otros componentes dentro de la spora como quitinasas, fosfolipasas, α -exotoxinas y enterotoxinas que sinergizan el efecto de la toxinas Cry

(Lereclus *et al.*, 1996). La participación de estos factores de virulencia ha sido demostrada por experimentos de mutagénesis sobre los genes que codifican para los mismos (Lereclus *et al.*, 1996; Fedhila *et al.*, 2002).

Existe una larga historia del uso de Bt en aerosol en el control de insectos que constituyen plagas agrícolas a la que se suma el empleo, más reciente, de *Bacillus thuringiensis* subesp *israelensis* (Bti) y *Bacillus sphaericus* (Bsp) para el control de mosquitos y moscas que constituyen vectores de enfermedades para seres humanos. Además, desde el año 1996 se han comercializado de forma exitosa plantas transgénicas que expresan proteínas producidas por Bt, las cuales les confieren a los cultivos resistencia a varios insectos plagas. Es por ello que constituye una alternativa atractiva a los insecticidas químicos comúnmente empleados en el control de insectos que constituyen plagas agrícolas y vectores de enfermedades de importancia para la salud humana.

1.2 Bt y su relación con otras bacterias del género *Bacillus*

A nivel de genoma Bt está muy relacionado con *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*, de modo que se pueden considerar como parte de una misma especie. La diferencia principal entre las tres bacterias se encuentra en la información genética codificada en cada uno de sus distintos plásmidos. En el caso de Bt aparecen plásmidos que codifican para proteínas cristalinas con características insecticidas; mientras que *B. anthracis*, un patógeno para humanos y animales, posee dos plásmidos únicos que codifican para los factores de virulencia. *B. cereus* ocupa el mismo nicho ecológico que Bt, pero no produce cristales y se caracteriza fundamentalmente por su motilidad.

Bacillus sphaericus es una bacteria que forma esporas esféricas la cual es tóxica a insectos dípteros. Al igual que Bt, esta bacteria debe sus características insecticidas a la presencia de una toxina binaria (BinA/BinB) la cual se acumula en inclusiones cristalinas durante la esporulación. Existen cepas que no producen cristales, sin embargo conservan su toxicidad debido a la presencia de proteínas de tipo soluble (Mtx) producidas durante la fase vegetativa del crecimiento celular.

Paenibacillus popilliae es una bacteria tóxica hacia larvas de coleópteros, específicamente el escarabajo Japonés, contra el cual ha sido empleado como agente de control durante más de 50 años (Koppenhöfer *et al.*, 2000). Este coleóptero constituye

una plaga de importancia en el este de los Estados Unidos donde el empleo de químicos está regulado estrictamente. El efecto tóxico de *P. popilliae* ha sido atribuido a proteínas contenidas dentro de inclusiones cristalinas parasporales semejantes a las toxinas Cry de Bt (Zhang *et al.*, 1997). Específicamente, esta bacteria produce la toxina Cry18Aa1 la cual posee una alta similitud de secuencia con las toxinas Cry2 y Cry11 de Bt (Zhang *et al.*, 1997).

Por último *Brevibacillus laterosporus* y algunas cepas de *Clostridium bifermentans* producen cristales que le confieren toxicidad hacia insectos dípteros (Smirnova *et al.*, 1996). Las toxinas cristalinas producidas por estas bacterias poseen un gran parecido con las toxinas Cry16 y Cry17 de Bt con actividad hacia *A. aegypti*.

1.3 *Bacillus thuringiensis* subespecie *israeliensis* (Bti)

La cepa de *Bacillus thuringiensis* subespecie *israeliensis* (Bti) fue aislada por primera vez en el desierto de Israel, motivo al cual debe su nombre. El descubrimiento de la cepa fue realizado por Goldberg y Margalit en 1977. Esta bacteria es altamente tóxica a mosquitos del género *Aedes*, *Culex* y *Anopheles* los cuales constituyen vectores de enfermedades que afectan a los seres humanos (Margalith and Ben-Dov, 2000).

Bti se ha empleado en programas de control de vectores durante más de 20 años y los bioinsecticidas realizados con esta cepa han tenido mucho éxito en África, Asia y Canadá. Es aceptada como una excelente alternativa a los insecticidas químicos por su alta especificidad tóxica. Además es inocua hacia organismos superiores y totalmente biodegradable.

Sin embargo, el empleo de Bti en algunas regiones es aun limitado. La manipulación de las preparaciones a base de esta bacteria es complicada pues las formulaciones deben permanecer en la superficie para que las larvas se alimenten correctamente y uno de los problemas más comunes es el hundimiento de las mismas (Rashed and Mulla, 1989). Además, gran parte de la muestra aplicada es poco estable en el medio ambiente ya sea por degradación (Margalit and Bobroglo, 1984; Ohana *et al.*, 1987), destrucción por las radiaciones ultravioletas (Cohen, 1991; Pusztai *et al.*, 1991) o por servir de alimento a otros organismos para los cuales no resulta tóxica (Blaustein and Margalit, 1991). Este hecho conlleva a la necesidad de aplicarla frecuentemente lo cual aumenten los costos

de producción de las formulaciones cuando se comparan con los químicos de uso común.

El efecto tóxico de Bti, se debe, particularmente, a la presencia de cuatro toxinas Cry (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa y Cry10A) y dos proteínas Cyt (Cyt1Aa y Cyt2A) (Guerchicoff *et al.*, 1997). Se ha observado que el empleo de Bti en campo no genera poblaciones de insectos resistentes (Guillet *et al.*, 1990; Regis *et al.*, 2000) en contraste con lo reportado respecto al uso de *Bacillus sphaericus* (Georghiou *et al.*, 1992). Mientras que en los cristales de Bti se encuentran diferentes toxinas Cry y Cyt, los cristales de *B. sphaericus* solo presentan una toxina binaria responsable del efecto insecticida de la bacteria. Se propone que el hecho de que Bti cuente con dos tipos de toxinas con mecanismos de acción diferentes (Cry y Cyt), es lo que ha contribuido a la baja aparición de insectos resistentes a esta bacteria. En este sentido se ha propuesto que la toxina Cyt1A sinergiza la acción de las toxinas Cry contenidas en el cristal.

Las primeras evidencias del sinergismo de las toxinas de Bti se tuvieron en 1985 y están basadas en la observación de que la mezcla de las proteínas presentes en el cristal era mucho más tóxica que la suma de las toxicidades de las toxinas independientes (Wu and Chang, 1985). Desde entonces se ha demostrado que la co-expresión de las toxinas Cry11Aa y Cyt1Aa sinergiza la actividad de Cry11Aa (Wu *et al.*, 1994) e incluso permite expresar a esta toxina sin necesidad de emplear proteínas chaperonas, las cuales son necesarias en ausencia de Cyt1A (Chang *et al.*, 1993). Sin embargo el mecanismo molecular por el cual las toxinas Cry de Bti y la toxina binaria de *B. sphaericus* sinergizan con Cyt1Aa no se conoce. Además experimentos realizados con el mosquito *Culex quinquefasciatus*, en los cuales se han aislado poblaciones de insectos resistentes a las toxinas Cry4A, 4B y 11A de Bti seleccionadas de manera independiente o en combinación, las cuales revierten el fenotipo de resistencia cuando se mezclan con Cyt1Aa (Georghiou and Wirth, 1997).

Reportes más recientes sugieren que Cyt1Aa sinergiza la toxicidad de la toxina binaria de *B. sphaericus*, hacia larvas del mosquito *C. quinquefasciatus* resistentes y le confiere toxicidad a esta toxina hacia larvas de *A. aegypti* (Wirth *et al.*, 2000; ^bWirth *et al.*, 2000). Además, se existen reportes que sugieren que la toxina Cyt1A facilita la internalización de toxinas la toxina binaria de *B. sphaericus* (Wirth and Federici, datos mostrados en congresos).

Capítulo 2. δ -endotoxinas producidas por *Bacillus thuringiensis*

2.1 Características generales

El efecto tóxico de *Bacillus thuringiensis* esta dado, en gran medida, a la presencia de δ -endotoxinas que se encuentran contenidas dentro de un cristal parasporal formado durante la fase de esporulación de la bacteria. Las δ -endotoxinas varían en cuanto a estructura y modo de acción y están separadas en dos familias de proteínas las Cry (cristal) y las Cyt (efecto citotóxico *in vitro*). Las más abundantes, dentro de las de tipo Cry, son las llamadas proteínas Cry de tres dominios. Este grupo contiene más de 30 tipos básicos diferentes y cientos de subtipos con diferentes especificidades en cada caso.

Las toxinas Cry de tres dominios son tóxicas a diferentes órdenes de insectos dentro de los que se incluyen Lepidópteros, Dípteros, Coleópteros e Himenópteros y Nemátodos tales como *C. elegans*. En contraste, las toxinas Cyt están presentes en cepas de Bt activas contra mosquitos. Debido a la actividad insecticida de las toxinas Cry, estas han sido empleadas en forma de aerosol o en plantas transgénicas para combatir plagas agrícolas o mosquitos que constituyen vectores de enfermedades importantes para los humanos.

2.2 Clasificación de las toxinas Cry

En un principio las toxinas Cry fueron clasificadas atendiendo a su especificidad e identidad de secuencia. Esta clasificación, dada a las toxinas Cry por Höfte y Whiteley en el 1989, fue sustituida en 1998 por una nueva nomenclatura basada solamente en la identidad de secuencia primaria de las mismas (Crickmore *et al.*, 1998).

Atendiendo a esta clasificación las toxinas se nombran con el prefijo Cry y se adicionan cuatro caracteres en cada caso. El primer carácter está dado por un número arábigo y sólo en aquellos casos donde la identidad de secuencia es menor a un 45% cambia dicho número. El segundo caracter es una letra mayúscula, la cual cambia sólo en los casos donde la identidad a nivel de genoma es mayor del 45%; pero menor del 75%. En la tercera posición se ubica una letra minúscula la cual cambia en los casos donde la identidad sea mayor del 75% y menor del 95%. Por último para diferenciar entre proteínas que sólo varían en unos pocos residuos se asignó un cuarto caracter que

consiste en un número arábigo y solo se emplea en casos donde la identidad de secuencia es mayor a un 95% (Crickmore *et al.*, 1998).

2.3 Estructura tridimensional de las toxinas Cry y Cyt producidas por *Bacillus thuringiensis*

El alineamiento y análisis de secuencias de toxinas Cry revela la presencia de cinco regiones con alta identidad entre ellas. A estas regiones se les denominan bloques conservados y están constituidos por amino ácidos importantes desde el punto de vista estructural involucrados en el contacto entre dominios. Se ha propuesto que las toxinas Cry que poseen estos bloques presentan una estructura tridimensional similar (Höfte and Whiteley, 1989; Li *et al.*, 1991).

Hasta la fecha, se han resuelto las estructuras de las formas activadas por proteasas *in vitro* de Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995), Cry3Aa (Li *et al.*, 1991), Cry3Bb (Galitsky *et al.*, 2001), Cry4B (Boonserm *et al.*, 2005) y Cry4A (Boonserm *et al.* 2006) y de la protoxina de Cry2Aa (Morse *et al.*, 2001).

La toxina Cry1Aa es activa contra insectos lepidópteros, la toxina Cry3Aa contra coleópteros, las toxinas Cry4Ba y Cry4A contra dípteros y la toxina Cry2Aa posee actividad dual contra dípteros y lepidópteros. En todos los casos se trata de toxinas Cry con una estructura de tres dominios, altamente conservados, cada uno de los cuales posee alrededor de 200 amino ácidos. En la figura 1 se presenta cuatro de las toxinas Cry de estructura conocida. Se puede observar que aun cuando se trata de proteínas Cry con especificidad hacia diferentes órdenes de insectos, todas muestran características estructurales similares.

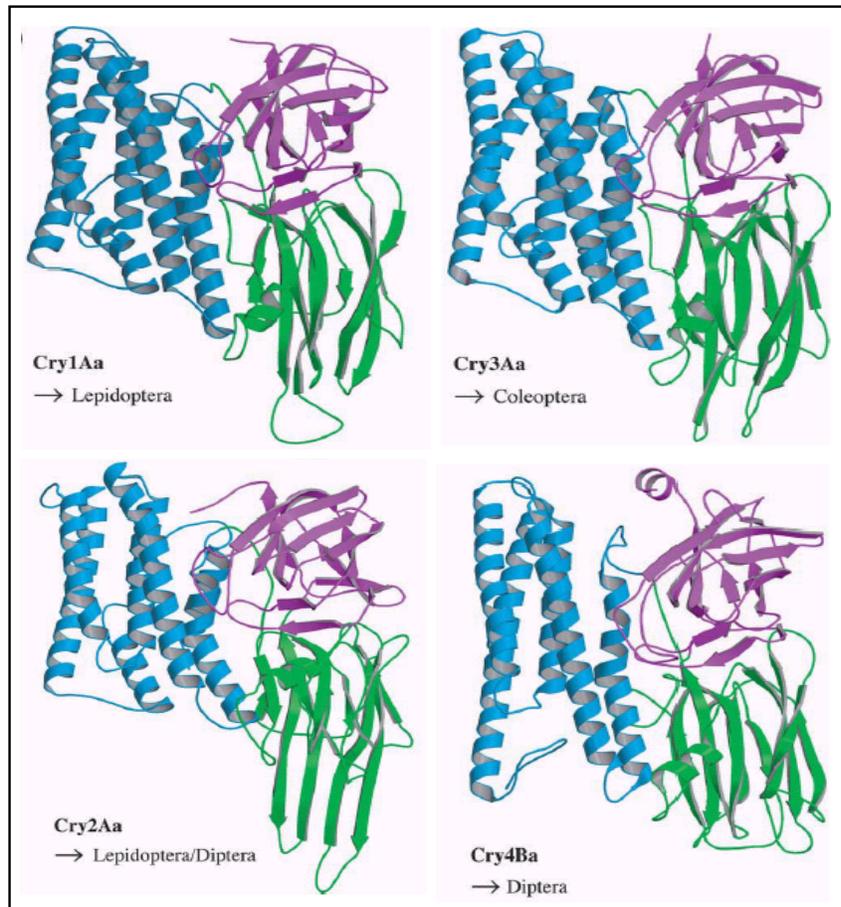


Figura 1. Estructura tridimensional de toxinas Cry activas contra diferentes órdenes de insectos (tomado de Boonserm *et al.*, 2005). En todos los casos el dominio I se muestra en azul, el dominio II en verde y el dominio III en rosa.

El dominio I (figura 2), está formado por siete hélices α , seis de las cuales poseen características anfipáticas y se encuentran rodeando a la hélice α_5 más hidrofóbica. Este dominio está involucrado en la inserción de la toxina en la membrana del insecto blanco y la formación del poro. Este hecho está apoyado por diversos estudios con toxinas Cry mutantes sobre este dominio. Además de la similitud estructural de dicho dominio con los de otras toxinas bacterianas formadoras de poro como son la hemolisina E, las colicanas Ia y N y el dominio de translocación de la toxina de difteria y por último por la presencia de cinco hélices α externas lo suficientemente largas como para insertarse en la membrana.

Por otra parte, existen evidencias de que el dominio I, expresado independientemente, tiene la capacidad de insertarse en vesículas de fosfolípidos; aún cuando la actividad de

formación de poro es mucho menos eficiente que cuando se trata de la toxina completa (Schnepf *et al.*, 1998).

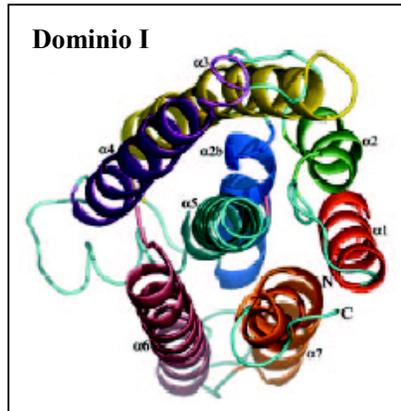


Figura 2. Dominio I de la toxina Cry4Aa (tomado de Boonserm *et al.*, 2006)

El dominio II consiste de tres láminas β antiparalelas con una topología que se asemeja a una conformación de llave griega, formando un β prisma. Las láminas β se encuentran unidas entre sí por regiones lazos que varían en tamaño y donde se encuentra la mayor variabilidad a nivel de secuencia entre diferentes toxinas Cry. Este dominio y en especial las regiones lazos que conectan las láminas β , ha sido descrito como el dominio más importante involucrado en la interacción de las toxinas Cry con sus receptores (revisado en Schnepf *et al.*, 1998) (Figura 3).

El dominio III es un β -sandwich formado por dos láminas β antiparalelas. Este dominio ha sido asociado con más de una función entre las que se encuentran: actividad de formación de poro (Chen *et al.*, 1993; Wolfersberger *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 1997), función de protección proteolítica (Li *et al.*, 1991), reconocimiento de N-acetil galactosamina sobre las moléculas receptoras, a través de estructuras tipo lectinas como sucede con la toxina Cry1Ac (Burton *et al.*, 1999) e interacción toxina-receptor (Lee MK *et al.*, 1995; de Maagd RA *et al.*, 1996; de Maagd RA *et al.*, 1999; de Maagd *et al.*, 2000).

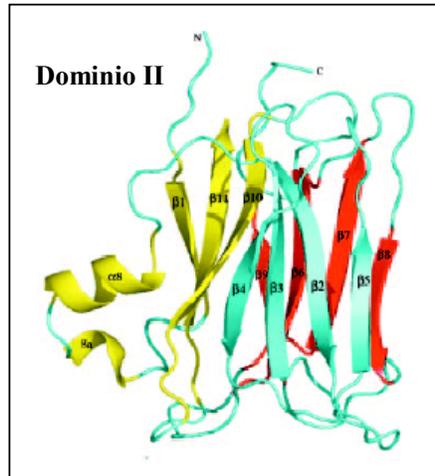


Figura 3. Dominio II de la toxina Cry4Aa (tomado de Boonserm P *et al.*, 2006)

Además, posee similitud estructural con el dominio IV de la toxina formadora de poro aerolisina el cual está involucrado en la estabilidad del complejo heptamérico de la misma. En la figura 4 se muestra la estructura del dominio III de la toxina Cry4Aa.

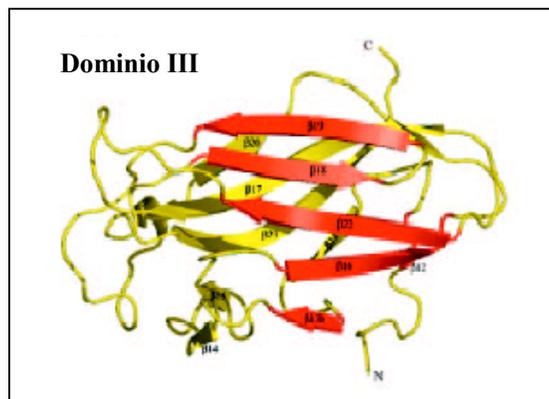


Figura 4. Dominio III de la toxina Cry4Aa (tomado de Boonserm *et al.*, 2006)

Por otra parte, la estructura tridimensional de la toxina Cyt2Aa1 ha sido determinada por cristalografía de rayos X, en ausencia de lípidos (Li *et al.*, 1996). El análisis de la misma, revela una proteína de 25kDa formada por un dominio simple constituido por tres capas de alfa-beta proteína con un plegamiento único. En la estructura las hélices α externas delimitan un centro formado por un ramillete de láminas β (Figura 5).

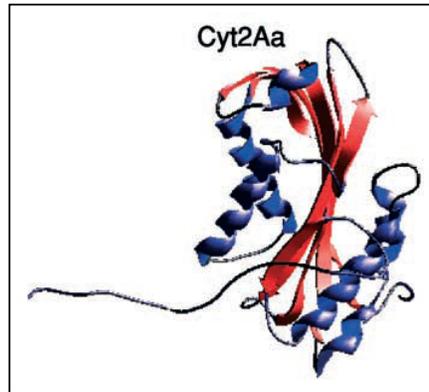


Figura 5. Estructura tridimensional de la toxina Cyt2Aa de Bti (Li *et al.*, 1996)

El alineamiento de secuencias de diferentes toxinas Cyt muestra la presencia de cuatro bloques conservados que corresponden a las hélices A, el lazo que sigue a la hélice D junto con la $\beta 4$, las $\beta 5$ y 6 y la $\beta 6a$ junto con el lazo siguiente (revisado en Butko, 2003). Estas toxinas se catalogan dentro de dos grandes grupos (Cyt 1 y Cyt 2) con ocho subclases diferentes.

Capítulo 3. Mecanismo de acción de las toxinas Cry

3.1 Mecanismo de acción general

Para desplegar su acción tóxica, las toxinas Cry deben ser solubilizadas de los cristales parasporales en los que se encuentran contenidas dentro de la bacteria, proceso que se desencadena cuando un insecto blanco ingiere los mismos. Aunque el mecanismo de acción de las toxinas Cry no ha sido descrito aun de forma detallada, existen un gran número de evidencias que han ayudado a aclararlo. La mayoría de la información reportada proviene de experimentos realizados con insectos lepidópteros los cuales son más fáciles de manipular en condiciones de laboratorio.

De manera general el mecanismo de acción de las toxinas Cry involucra cinco pasos fundamentales dentro de los cuales se encuentran la solubilización de los cristales, activación de las protoxinas liberadas, unión al receptor, formación de una estructura de pre-poro y e inserción en la membrana para crear un poro lítico (Schnepf *et al.*, 1998; Rajamohan *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001). Ahora se conoce que la interacción de las toxinas Cry con las membranas de los insectos blanco, involucra más de un receptor y que la interacción con los mismos es un proceso secuencial (Bravo *et al.*, 2004) (figura 7, página 51).

3.2 Solubilización

Para ejercer su efecto tóxico, las protoxinas Cry y Cyt son solubilizadas del cristal parasporal que las contiene. Este proceso, ocurre en el intestino de los insectos blancos bajo características de pH específicas y en un ambiente reductor. El ambiente reductor es necesario porque la región carboxilo de muchas de las toxinas Cry presenta varios residuos de cisteínas que forman puentes disulfuro.

Una vez liberadas del cristal, encontramos protoxinas Cry de dos longitudes diferentes (70 o 130 kDa). En el caso de las protoxinas de 130 kDa la región C-terminal no es necesaria para la acción tóxica, sinoque parece estar involucrada en la estructuración del cristal dentro de la bacteria. Dicha región es eliminada durante la activación proteolítica de las proteínas.

Se ha documentado que la solubilización de los cristales constituye un paso limitante que determina la toxicidad y especificidad de las diferentes toxinas Cry. Ésta es dependiente del pH intestinal del insecto blanco el cual varía entre diferentes especies, por ejemplo, en la mayoría de los insectos lepidópteros y dípteros presenta un pH altamente alcalino (Knowles, 1994); mientras que en el caso de los coleópteros el pH intestinal tiende a ser ácido.

La solubilización de las protoxinas Cyt y Cry, activas contra mosquito, ocurre a pH alcalino.

3.3 Activación

Una vez solubles, las protoxinas inactivas son activadas en el intestino del insecto por medio de proteólisis discreta. En este proceso participan proteasas específicas que remueven, principalmente, la región C-terminal para generar toxinas activas de aproximadamente 70 kDa (de Maagd *et al.*, 2001). Se piensa que en el intestino de insectos lepidópteros y dípteros las proteasas involucradas en este paso son del tipo tripsina y quimiotripsina; pues la activación *in vitro* de protoxinas Cry con este tipo de proteasas produce toxinas que conservan su efecto letal *in vivo*.

En el caso de protoxinas Cry1A, se ha reportado, que son necesarios cortes proteolíticos progresivos, de 10 kDa cada uno, que provocan la eliminación del 50% de la región carboxilo terminal de la molécula (aproximadamente 600 amino ácidos). Además, se eliminan 28 amino ácidos del extremo amino terminal (revisado en Porter *et al.*, 1993). Dado a que el extremo carboxilo terminal de este tipo de toxinas no es necesario para la toxicidad, se ha sugerido que esta región podría participar en la estabilización de la protoxina y evitar la activación prematura de la misma (Knowels, 1994).

Es importante mencionar que todas las toxinas Cry son procesadas en la región amino terminal. En el caso de la protoxina Cry2Aa se ha reportado que posee una región amino de 28 aa, que se encuentra ocluyendo el posible sitio de unión al receptor, mismo que es procesado durante la activación dando lugar a la exposición del sitio (Morse *et al.*, 2001). Por otra parte se ha descrito que mutantes de Cry1Ac afectadas en el procesamiento de la región amino terminal (activación *in vitro* por tripsina), están afectadas en toxicidad, unión al receptor y formación de poro en membranas de *Manduca sexta* (Bravo *et al.*, 2002).

Además, existen algunas toxinas Cry que son procesadas intra-molecularmente durante el proceso de activación. Tal es el caso de la toxina Cry11Aa de Bti, la cual sufre un corte proteolítico en la arginina 326 para producir dos polipéptidos que se mantienen asociados por interacciones hidrofóbicas y puentes salinos y donde ambos fragmentos son necesarios para la actividad tóxica de la toxina (Dai and Gill, 1993; Yamagiwa *et al.*, 2002; Yamagiwa *et al.*, 2004; Revina *et al.*, 2004). Otro ejemplo de procesamiento proteolítico intra-molecular es la toxina Cry4B la cual es procesada proteolíticamente durante su activación con jugo gástrico de larvas de *Culex pipiens* para dar lugar a dos fragmentos de 46 y 18 kDa (Komano *et al.*, 1998). En este caso, también ambos fragmentos permanecen asociados cuando la proteína es purificada por cromatografía de filtración en gel y son necesarios para que se conserve la toxicidad hacia *C. pipiens* (Yamagiwa *et al.*, 1999).

El proceso de activación es otro de los pasos que contribuye a la especificidad de las toxinas Cry. Se propone que las proteasas involucradas en este proceso son específicas para cada insecto, lo cual determina la especificidad en este sentido (revisado en Porter *et al.*, 1993).

3.4 Unión al receptor

Desde que Hofmann y colaboradores demostraron que las toxinas Cry podían interactuar con alta afinidad con vesículas de la microvellosidad apical (VMMA), la unión a estas regiones ha sido el paso más estudiado del mecanismo de acción de las toxinas Cry. Se ha descrito que una vez activas, las toxinas Cry se unen a receptores específicos y forman canales iónicos sobre las células blanco.

Los receptores para toxinas Cry, son proteínas que se encuentran ubicados en la región apical de las células intestinales de los insectos susceptibles. Hasta la fecha han sido descritas cuatro tipos de proteínas receptoras para toxinas Cry. Estas son proteínas tipo caderinas, aminopeptidasa N (APN), fosfatasa alcalina (ALP) y Glicoconjugados. Dichas moléculas poseen una función importante para el desarrollo adecuado del insecto por lo que se ha observado que las larvas que presentan mutaciones sobre los receptores para toxinas Cry están menos adaptadas para sobrevivir ya que carecen de proteínas que son importantes desde el punto de vista metabólico. Como resultado son larvas afectadas en crecimiento y capacidad de reproducción.

Generalmente la unión de toxinas Cry a receptores que constituyen enzimas digestivas importantes para el insecto blanco no afecta la actividad de los mismos, sin embargo existen dos ejemplos reportados para insectos lepidópteros donde la interacción de la toxina Cry1Ac con la ALP de los insectos lepidópteros *M. sexta* y *Heliotis virescens* resulta en una inhibición de la actividad enzimática (Sangadala *et al.*, 1994; English and Readdy, 1989).

La unión de las toxinas Cry a sus receptores esta mediada por la interacción de los lazos que conectan las hojas β dominio II. Estas regiones han sido descritas como las más variables en cuanto a secuencia cuando se comparan las diferentes toxinas Cry. Ensayos de mutagénesis sitio dirigida han permitido identificar residuos específicos sobre las toxinas Cry, importantes para la interacción de estas con los receptores presentes en las membranas de los insectos hacia los cuales son tóxicas (Dean *et al.*, 1996).

Por ejemplo, el cambio puntual por alanina de la fenilalanina 371, ubicada sobre el lazo 2 del dominio II de Cry1Ab, provoca la reducción de la toxicidad de la toxina hacia *M. sexta*; pero no afecta la toxicidad hacia *Heliotis virescens*. Sin embargo, el cambio por alanina de los residuos G439 y F440 localizados en el lazo 3 del mismo dominio, afectan la unión al receptor y reducen la toxicidad de la toxina hacia ambos insectos (Rajamohan *et al.*, 1996). Además, se ha reportado que una triple mutante de Cry1Ab construida sobre los lazos $\alpha 8$ y 2 del dominio II, posee una capacidad de unión 18 veces mayor y una actividad toxica 36 veces mayor, que la toxina silvestre, hacia larvas de *Limantria dispar* (Rajamohan *et al.*, 1996).

Otros estudios han permitido determinar que la región del dominio II de la toxina Cry1Ac, que involucra a los residuos 335 al 450, es importante para determinar la toxicidad de esta toxina hacia el insecto *Trichoplusia ni*; pero no participa en la toxicidad de la toxina hacia *Heliotis virescens* en la cual parece participar la región que involucra los residuos del 450 al 615 (Ge *et al.*, 1991).

En un reporte reciente, se muestra que mutagénesis de la toxina Cry1Aa, activa contra insectos lepidópteros, donde se incluyen varias sustituciones y deleciones sobre los lazos del dominio II resultó en un ligero aumento de la toxicidad hacia el mosquito *C. pipiens* y pierde la toxicidad hacia el lepidóptero *M. sexta* (Liu and Dean, 2006). Este hecho demuestra que cambios puntuales sobre los lazos del dominio II de las toxinas

Cry, pueden modificar la especificidad de este tipo de toxinas. Destacando la participación de estas regiones como determinantes importantes de la especificidad de las toxinas Cry.

Por otra parte, existen evidencias que proponen que no solo las regiones lazo del dominio II de las toxinas Cry son importantes en la interacción toxina-receptor; sino que también participan fragmentos de láminas β . En este sentido, experimentos de intercambio de segmentos entre toxinas con diferente especificidad, han permitido identificar las regiones de la toxina Cry1Aa involucradas en la toxicidad hacia el lepidóptero *Bombyx mori*. La región comprendida entre los residuos 332 y 450 del dominio II de ambas toxinas fueron intercambiadas entre sí, confiriéndole toxicidad a Cry1Ac hacia dicho insecto, el cual en condiciones normales es resistente a esta toxina (Ge *et al.*, 1989).

Finalmente, el dominio III de las toxinas Cry también ha sido involucrado directamente en el reconocimiento del receptor. Existen hasta la fecha múltiples reportes que apoyan este hecho (Lee *et al.*, 1995; de Maagd *et al.*, 1996; de Maagd *et al.*, 1999; de Maagd *et al.*, 2000). El ejemplo, más reciente describe un sitio de unión sobre el dominio III de la toxina Cry1Aa importante para la interacción con la aminopeptidasa N de *B. mori* (Atsumi *et al.*, 2005).

Experimentos *in vitro* realizados empleando toxinas Cry marcadas radioactivamente y vesículas de microvellosidad de membrana apical (VMMA), han demostrado que la unión al receptor ocurre en dos pasos. El primero comprende la unión reversible al receptor y el segundo la interacción irreversible de la toxina con la membrana (Liang *et al.*, 1995). La unión reversible tiene en cuenta la interacción con el receptor; mientras que la irreversible ocurre cuando la toxina se inserta en la membrana (revisado en Porter *et al.*, 1993).

Por lo general, existe una relación directa entre la afinidad y la toxicidad de las toxinas Cry. Sin embargo existen excepciones a lo que pareciera ser la regla general. Tal es el caso de la toxina Cry1Ab y Cry1Ac que afectan de diferente forma al lepidóptero *Lymantria dispar*. En este caso Cry1Ab se une con menor afinidad al intestino del insecto si se compara con la toxina Cry1Ac. Sin embargo esta última posee una actividad insecticida reducida contra este insecto cuando se compara con la actividad de

Cry1Ab (Wolfersberger, 1990). Este efecto tiene sentido si se considera que en el caso de Cry1Ab se encuentra una mayor cantidad de toxina insertada en membrana (unión irreversible) que la observada para Cry1Ac. Para el caso de la unión de la toxina Cry1Ac a su receptor aminopeptidasa N en este insecto, se ha demostrado que ocurre una unión secuencial bivalente. El primer contacto involucra la interacción a través del dominio III, de la toxina con la APN. Esta unión provoca cambios en la conformación de la proteína que permiten la exposición de regiones del dominio II de la toxina. Ocurre entonces un segundo contacto entre lazos de este dominio y la APN (Jenkins *et al.*, 2000).

En el caso de las toxinas Cyt no existen en el intestino del insecto receptores protéicos descritos; sino que la toxina interactúa directamente con lípidos de membrana por los cuales posee una alta afinidad (Knowles *et al.*, 1989; Promdonkoy B and Ellar, 2000; Promdonkoy B and Ellar, 2005). Experimentos de mutaciones sistemáticas, realizados sobre Cyt1Aa1 muestran que las regiones de la proteína, involucradas en la unión a lípidos y responsables de la toxicidad, son los lazos superiores de la molécula, teniendo en cuenta la orientación que se muestra en la figura 5 (Ward *et al.*, 1998).

3.5 Inserción en membranas

Como ya comentamos, existen evidencias que sugieren que la inserción en las membranas de las toxinas Cry ocurre por medio del dominio I. Hasta la fecha, se proponen dos posibles mecanismos de inserción en membrana: el modelo de sombrilla y el de abrecartas. Ambos modelos han sido propuestos para explicar el mecanismo de inserción en membranas de otras toxinas bacterianas y se basan en la idea de que solo una parte del dominio de inserción se introduce en la membrana.

El modelo de abrecartas, es un modelo más antiguo y propone que las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ se proyectan de la estructura de la toxina y se insertan en la membrana como lo haría un abrecartas; mientras que el resto de la toxina no cambia estructuralmente y se ubica sobre la membrana o permanece unido al receptor (Hodgman and Ellar, 1990).

En cambio en el modelo de sombrilla, se propone que el lazo hidrofóbico entre las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ es la primera región en insertarse en la membrana y que el resto de las hélices se colocan en la interfase lípido-agua. Este modelo está apoyado por resultados experimentales donde se muestran que mutantes construidas sobre la región lazo que

une las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ del dominio I de la toxina Cry1Ab están afectadas en formación de poro en las membranas del lepidóptero *M. sexta* (Chen *et al.*, 1995; Hussian *et al.*, 1996). Por otro lado, toxinas Cry1Aa a las cuales se les inmovilizaron las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ por introducción de enlaces disulfuro con el dominio II o con las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 6$ están afectadas en formación de poro en membranas sintéticas (Schwartz *et al.*, 1997).

Aunque existen experimentos de inmunocitoquímica que sugieren que las toxinas Cry interaccionan con las membranas sin que ocurra internalización (Bravo *et al.*, 1992); reportes recientes demuestran que en casos específicos la unión de la toxina conlleva a una cascada de señalización intracelular (Zhang *et al.*, 2006) y en algunos casos puede activar la expresión de genes de respuesta a estrés que programan a la célula para que ocurra apoptosis (Griffits *et al.*, 2003).

En el caso de toxinas Cyt se han descrito dos mecanismos diferentes de inserción en membranas. En el primero, entre cuatro y seis monómeros de la toxina forman un poro estructurado dentro de la membrana (Knowles *et al.*, 1989; Promdonkoy and Ellar, 2000; Promdonkoy and Ellar, 2005) y en el segundo las toxinas Cyt ejercen una acción de detergente, menos específica por la interacción de muchos monómeros de la toxina con la membrana (Butko, 2003). Existen algunos reportes que sugieren que estos dos mecanismos de acción no son mutuamente excluyentes y que dependen de la concentración de toxina. De modo que el empleo de dosis sub-letales provoca formación de poros; mientras que altas dosis de toxinas provocan un efecto detergente sobre las membranas.

Una vez insertadas en las membranas, las toxinas Cry y Cyt inducen la formación de canales iónicos o poros inespecíficos. En ambos casos el resultado final es la destrucción del epitelio intestinal y la consecuente muerte del insecto.

3.6 Oligomerización y formación de poro

Una vez que las toxinas Cry interactúan con sus receptores en las membranas intestinales del insecto blanco ocurre una rápida e irreversible inserción. En un principio, se sugirió que la unión toxina-receptor desencadena una serie de cambios conformacionales sobre la toxina que conducen a la inserción de la misma (Rajamohan *et al.*, 1998). Ahora se conoce que, al menos en el caso de las toxinas Cry1A, la unión a diferentes receptores ocurre de manera secuencial. El primer contacto tiene lugar entre

la forma monomérica de la toxina con receptores tipo caderinas, el cual induce un cambio conformacional en la toxina que expone un sitio de corte en la hélice $\alpha 1$ (Gómez *et al.*, 2002). El corte proteolítico de dicha región conduce a la formación de una estructura oligomérica, posiblemente formada por cuatro sub-unidades monoméricas. El oligómero entonces, pierde afinidad por el primer receptor y se une con mayor afinidad a un segundo receptor, que en este caso es una proteína aminopeptidasa-N anclada por glicosil fosfatidil inositol (GPI). De modo general los receptores anclados por GPI se localizan en micro-regiones de la membrana conocidas como balsas lipídicas las cuales presenta una estructura más ordenada ya que están enriquecidas en esfingolípidos y colesterol (Zhuang *et al.*, 2002). La unión al segundo receptor facilita la inserción del oligómero en las balsas lipídicas y la formación de poros líticos que conducen a la muerte del insecto (Bravo *et al.*, 2004).

Capítulo 4. Moléculas receptoras para toxinas Cry

El motivo de preocupación principal en el empleo de toxinas Cry como biopesticidas es la aparición de insectos resistentes. El mecanismo de resistencia descrito con mayor frecuencia implica mutaciones sobre las moléculas que funcionan como receptores de toxinas Cry de modo que se afecta la interacción toxina-receptor.

Como había mencionado antes, hasta la fecha se han descrito cuatro moléculas receptoras para toxinas Cry1A, activas contra insectos lepidópteros. De este modo aparecen proteínas tipo caderinas (Vadlamudi *et al.*, 1995), aminopeptidasa N (APN) (Nagamatsu *et al.*, 1999; Knight *et al.*, 1994) anclada por GPI, fosfatasa alcalina anclada por GPI (ALP-GPI) (Jurat-Fuentes and Adang, 2004) y un glicoconjugado de 270 kDa (Valaitis *et al.*, 2001). Además, existe un reporte donde se propone que los glicolípidos pudieran participar como moléculas receptoras importantes para toxinas Cry activas contra nemátodos y algunos insectos (Griffits *et al.*, 2005).

En el caso de toxinas Cry activas contra insectos dípteros, poco se conoce acerca de los receptores. Para las toxinas Cry11Aa y Cry4B de Bti se han descrito dos proteínas de 62 y 65 kDa como proteínas de unión sobre el intestino de larvas de *Aedes aegypti* (Buzdin *et al.*, 2002). Sin embargo, la identidad de estas proteínas y su papel como receptores es aun desconocida.

4.1 Receptores tipo caderinas

Las caderinas son una gran familia de glicoproteínas que son responsables de la interacción célula-célula. Estas proteínas son moléculas transmembranales con un dominio citoplásmico y un dominio extra celular con múltiples repeticiones características (Nagamatsu *et al.*, 1999). A diferencia de las caderinas clásicas, las proteínas tipo caderinas que actúan como moléculas receptoras para toxinas Cry, están localizadas en la región apical de las células epiteliales del intestino de los insectos. Específicamente, se conoce que la proteína tipo caderina que funciona como receptor para las toxinas Cry1A sobre el intestino del lepidóptero *M. sexta*, está localizado en la microvellosidad apical de las células intestinales (Chen *et al.*, 2005).

El papel de las proteínas tipo caderinas como receptores para toxinas Cry1A fue demostrado por la selección de una línea de *H. virescens* resistente a Cry1Ac. Esta línea

resistente, llamada YHD2 posee una inserción de un transposón que incluye un codón de paro de la traducción del gen que codifica para la proteína tipo caderina (Gahan *et al.*, 2001). Por otra parte, el análisis de los alelos que codifican para proteínas tipo caderinas de cepas de *Pectinophora gossypiella* resistentes a Cry1Ac, generadas en campo y laboratorio, reveló tres tipos de mutaciones en este gen asociadas con el fenómeno de resistencia observado (Morin *et al.*, 2003).

La interacción entre las toxinas Cry1A y su receptor caderina ha sido, ampliamente, estudiada. Se han mapeado tres regiones importantes sobre la caderina y sus contrapartes sobre la toxina Cry1Ab. De esta forma se conoce que el lazo 2 del dominio II de la toxina Cry1Ab interactúa con la región ⁸⁶⁵NITIHITDTNN⁸⁷⁵ de la caderina; mientras que los lazos α 8 y 2 interactúan con la región ¹³³¹IPLPASILTVTV¹³⁴² ubicados en las repeticiones 7 y 11 de la caderina de *M. sexta* (Gomez *et al.*, 2002; Gomez *et al.*, 2003). Además se conoce que el lazo 3 del dominio II de la toxina Cry1Ac interactúa con la región ¹⁴²³GVLTLNFQ¹⁴³¹ ubicada en la repetición 12 de la caderina de *H. virescens* (Xie *et al.*, 2005).

4.2 Receptores anclados por GPI

Algunas de las proteínas ancladas por GPI a la microvellosidad apical de las células del intestino larvario participan también como receptores funcionales para toxinas Cry. Tal es el caso de las proteínas aminopeptidasa-N (Nagamatsu *et al.*, 1999; Knight *et al.*, 1994) y fosfatasa alcalina (Jurat-Fuentes and Adang, 2004) que funcionan como receptores para toxinas Cry1A y Cry1C.

Por otra parte una maltasa de *C. pipiens* anclada por GPI (cpm1), una α -glucosidasa que ha sido caracterizada como el receptor funcional para la toxina binaria producida por *B. sphaericus* (Darboux *et al.*, 2001).

Los insectos lepidópteros producen cuatro diferentes isoformas de aminopeptidasas N en el intestino de larvas (Oltean *et al.*, 1999). Diversos reportes demuestran el papel de la APN1 como receptor para toxinas activas contra lepidópteros. Por ejemplo, la selección de colonias de *Spodoptera exigua* resistentes a Cry1C, en laboratorio, muestran que las mismas no expresan la proteína APN1 (Herrero *et al.*, 2005). Además, la inhibición de la producción de APN1 en *S. littura*, a través de interferencia de ARN, muestra que los insectos afectados en la producción de la proteína son menos sensibles

a la toxina Cry1C (Rajagopal *et al.*, 2002). Por otra parte, la expresión heteróloga de la APN1 de *M. sexta* sobre el tejido mesodérmico intestinal de *Drosophila melanogaster* causa sensibilidad a la toxina Cry1Ac (Gill and Ellar, 2002).

Además una fosfatasa alcalina anclada por GPI, ha sido descrita como un posible receptor para la toxina Cry1Ac sobre el intestino de *M. sexta* (McNall and Adang, 2003). Además, una cepa de *H. virescens* con bajos niveles de producción de una ALP de 65 kDa correlaciona con la resistencia de este insecto a la toxina Cry1Ac (Jurat-Fuentes and Adang, 2004).

La fosfatasa alcalina es una metaloenzima dimérica con actividad fosfomonoesterasa no específica que contiene zinc. Esta enzima es una α/β proteína, que está presente en una amplia variedad de organismos que van desde las bacterias hasta los mamíferos. La comparación de secuencias de diferentes ALP de estructura conocida, sugiere que los dominios importantes desde el punto de vista funcional, están muy conservados (Somadski JM *et al.*, 1985).

Tanto la aminopeptidasa N como la fosfatasa alcalina, son proteínas que se encuentran ancladas en las membranas celulares por GPI. Se ha descrito, que las proteínas ancladas por GPI, se encuentran principalmente particionadas en microdominios dentro de las membranas celulares conocidos como balsas lipídicas (Munro, 2003). Estas regiones presentan una estructura ordenada y están enriquecidas en colesterol y esfingolípidos. A las balsas lipídicas se les ha involucrado en señalización intracelular y tráfico de proteínas hacia el interior de la célula (Munro, 2003).

Las proteínas aminopeptidasa N y fosfatasa alcalina que actúan como receptores para toxinas Cry en el intestino de larvas de los lepidópteros *H. virescens* y *M. sexta* se encuentran localizados en balsas lipídicas (Zhuang M *et al.*, 2002; Bravo A *et al.*, 2004). En contraste los receptores tipo caderinas se encuentran insertados en regiones de la membrana solubles en detergentes las cuales se encuentran espacialmente separadas de las balsas lipídicas.

Para el caso de toxinas Cry con especificidad contra otros tipos de insectos, es muy poco lo que se conoce con respecto a los receptores. En el caso específico de toxinas Cry tóxicas contra insectos dípteros, se han sugerido algunas posibles proteínas receptoras. En este sentido existen reportes que describen dos proteínas de 62 y 65 kDa

como receptores para las toxinas activas contra mosquitos Cry4Ba y Cry11Aa (Buzdin *et al.*, 2002); pero la identidad de dichas proteínas no ha sido reportada hasta el momento. Además se han identificado dos APNs en el intestino de larvas de *Aedes* y una en el intestino de *Anopheles quadrimaculatus*. En el primer caso, no existe ninguna evidencia de su papel como receptores para toxinas Cry (Pootanakit *et al.*, 2003). En el segundo la proteína de 100 kDa con actividad de aminopeptidasa, interactúa con la toxina Cry11Ba; pero no con Cry2Aa, Cry4Ba o Cry11Aa (Abdullah *et al.*, 2006).

Finalmente, existe un reporte de la existencia de una anhidrasa carbónica anclada por GPI que co-localizada en las mismas regiones que las toxinas Cry en el intestino de larvas de *Aedes* (Seron *et al.*, 2004), pero su papel como receptor no ha sido demostrado.

Capítulo 5. Otras toxinas producidas por *Bacillus thuringiensis*

5.1 Toxinas VIP

Existen otras proteínas insecticidas producidas por Bt que son excluidas de la nomenclatura de toxinas Cry por no ser formadoras de cristales. Estas proteínas son conocidas como proteínas VIPs, por sus siglas en inglés (vegetative insecticidal proteins), y como lo indica su nombre son secretadas desde la fase vegetativa del crecimiento de la bacteria y durante la fase de esporulación. Las mismas contribuyen a aumentar la virulencia de las toxinas Cry junto con algunos otros compuestos tipo antibióticos o con características fungicidas producidos por la bacteria (Struch *et al.*, 1996). Hasta la fecha se han reportado tres tipos de proteínas VIP (Vip1A, Vip2A y Vip3A).

Vip1A es una proteína de 100 kDa, la cual es procesada en la región amino para dar lugar a una versión de 80 kDa después de la secreción. Esta proteína es tóxica hacia larvas del gusano de maíz y actúa en conjunto con la proteína Vip2A por lo que se consideran toxinas binarias.

La figura 6 muestra la estructura tridimensional de la toxina Vip2. Se puede observar que está formada por una mezcla de hélices α y estructuras β , divididas en dos dominios estructuralmente homólogos. El plegamiento de cada dominio es parecido al dominio catalítico de las toxinas con actividad de ADP-ribosilación, como la toxina de difteria (Waren G, 1997). Sin embargo la proteína blanco de Vip2 no se conoce.

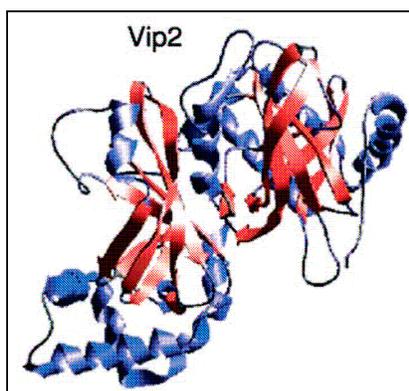


Figura 6. Estructura tridimensional de la toxina Vip2 (tomado de Bravo and Soberón, 2005)

Vip3A, es una proteína de 88 kDa que es producida durante la fase vegetativa del crecimiento pero, que a diferencia de las anteriores, no sufre procesamiento luego de ser secretada. Los genes que codifican a esta proteína son comúnmente encontrados en las diferentes cepas de *B. thuringiensis* y *B. cereus*. Se ha reportado que esta proteína posee actividad tóxica contra un amplio rango de insectos lepidópteros que constituyen plagas; tales como *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea* (Struch *et al.*, 1996). Además, se conoce que las manifestaciones físicas de la intoxicación con toxinas Vip3A son iguales a las producidas por toxinas Cry: parálisis intestinal y lisis de las células epiteliales (Yu *et al.*, 1997).

Capítulo 6. Toxina binaria (BinA/BinB) de *Bacillus sphaericus*

La toxina binaria (Bin) está presente en cepas de *B.s sphaericus* tóxicas contra mosquitos. El cristal contenido en dichas cepas está compuesto por dos proteínas homólogas y físicamente separadas, BinA de 42 kDa y BinB de 51 kDa, las cuales son depositadas dentro del exosporium en el momento de la esporulación (Broadwell and Baumann, 1986).

Cuando estas proteínas son producidas en *Echerichia coli*, son necesarias ambas para que se produzca un efecto tóxico sobre larvas de mosquito, y la mayor actividad se observa cuando las proteínas están en un radio equimolar (Broadwell *et al.*, 1990). En cambio, la producción de BinA sola en una cepa de *Bacillus thuringiensis*, es suficiente para obtener toxicidad contra larvas de mosquito (Nicolas *et al.*, 1993).

Al igual que las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*, la toxina binaria de *Bacillus sphaericus* es solubilizada y activada por proteólisis en el intestino de los insectos blanco (Broadwell and Baumann, 1987). Luego la toxina se une a receptores específicos ubicados en el epitelio intestinal y dicha unión desencadena el efecto tóxico, el cual es directamente proporcional en magnitud con la afinidad de unión (Nielsen-Leroux and Charles, 1992; Silva-Filha *et al.*, 1997).

Se ha reportado que el componente BinB es el encargado de garantizar la unión fuerte y regionalizada de la toxina binaria al receptor Cpm1 (Oei *et al.*, 1992; Charles *et al.*, 1997). La unión de Bin B con Cpm1 da lugar a cambios ultra-estructurales en las células epiteliales que sugieren que ocurre la formación de poros líticos sobre las membranas (Charles *et al.*, 2000).

Ensayos *in vitro* con membranas artificiales, sugieren que fundamentalmente BinA es responsable de la formación de canales en las membranas (Schwartz *et al.*, 2001); de modo que aunque ambas proteínas parecen tener un ancestro común existe una divergencia entre ambas en cuanto a su función.

A diferencia de lo que ocurre con *C. pipiens*, la proteína BinA parece estar involucrada en interacción con el receptor para la toxina binaria en *Anopheles gambiae* (Charles *et al.*, 1997). La estructura de BinB, correspondiente a los residuos del 29 al 421, ha sido

determinada y muestra un elipsoide formado predominantemente de hojas β plegadas (Chiou *et al.*, 1999).

Capítulo 7. Despliegue en fagos

La introducción en 1985 de una técnica novedosa conocida como despliegue en fagos (Smith, 1985), ha permitido a los investigadores contar con una metodología que permite estudiar interacciones moleculares. Mediante esta técnica, se pueden expresar péptidos, proteínas o anticuerpos en la superficie de un fago de forma tal que estos puedan ser utilizados para seleccionar contrapartes que interactúen con las primeras y así poder estudiar diversos tipos de interacciones moleculares.

El despliegue de fragmentos de anticuerpos, péptidos y proteínas pequeñas en la superficie de fagos filamentosos por fusión a una proteína de la cápside del fago (pIII) (McCafferty *et al.*, 1990; Barbas *et al.*, 1991; Breitling *et al.*, 1991; Garrard *et al.*, 1991; Hoogenboom *et al.*, 1991; Marks *et al.*, 1991; Griffiths *et al.*, 1994) y la selección contra una molécula de interés de los fagos que llevan secuencias de interacción específicas, constituye un poderoso método para identificar como interactúan dos moléculas con especificidad de unión predeterminada (Winter *et al.*, 1994). Para la obtención de dichas secuencias se puede partir de genes variables de inmunoglobulinas (Winter and Milstein, 1991) de animales inmunizados contra un antígeno específico o no inmunizados (Marks *et al.*, 1991; Hoogenboom and Winter, 1992), genes sintéticos (Soderlind *et al.*, 2000) o sus combinaciones (Rojas G *et al.*, 2002). De esta manera se pueden obtener fagos que interactúen con alta (Clackson *et al.*, 1991) o mediana afinidad y con actividad neutralizante contra virus (Barbas *et al.*, 1992; Moulard *et al.*, 2002) y toxinas (Gómez *et al.*, 2001), entre muchas otras opciones.

El despliegue de péptidos sobre la superficie de un fago y la selección de los mismos contra una proteína determinada, ha sido de gran utilidad para estudiar interacciones entre proteínas. A través de este método se pueden obtener, utilizando un mismo repertorio, secuencias con diferentes especificidades de unión (Soderlind *et al.*, 2000), lo cual incluye anticuerpos difíciles de obtener por inmunización como son los autoanticuerpos (Griffiths *et al.*, 1993).

La posibilidad que ofrece esta metodología para construir bibliotecas de gran diversidad molecular y seleccionar moléculas con propiedades determinadas la han hecho de amplia aplicación.

Existen muchos trabajos donde se ha utilizado el Despliegue en fagos para llevar a cabo el mapeo de epítopes (revisado en Kay *et al.*, 2000). De esta manera se ha podido definir la especificidad de dominios SH3 individuales (Sparks *et al.*, 1996; Grabs *et al.*, 1997); determinar los motivos de unión a dominios WW (Linn *et al.*, 1997) y dominios EH (Salcini *et al.*, 1997; Yamabhai *et al.*, 1998) o encontrar los residuos que determinan la especificidad de unión de los dominios PDZ (Doyle *et al.*, 1996).

Capítulo 8. Teoría del reconocimiento molecular

La teoría del reconocimiento molecular propone que las regiones de interacción entre dos proteínas pueden predecirse atendiendo a la complementariedad de sus perfiles de hidropatía. Así mismo, propone que dos proteínas que compartan perfiles de hidropatía pueden interaccionar con el mismo ligando (Blalock, 1990).

Desde la descripción de este concepto algunos grupos han tratado de demostrar su aplicación práctica. Es así como han surgido algunas evidencias experimentales que apoyan que el arreglo apropiado de amino ácidos polares y no polares determina la especificidad de una proteína. En este sentido surgen ejemplos en la bibliografía que muestran que el empleo de esta teoría ha permitido la síntesis de péptidos con actividad biológica o el diseño de proteínas con especificidad pre-determinada (Blalock *et al.*, 1999).

Aunque existen resultados experimentales que sugieren la validez de la teoría del reconocimiento molecular (Boquet *et al.*, 1995; Picard *et al.*, 1986), algunos autores se cuestionan si verdaderamente se puede aplicar en interacciones que ocurren *in vivo* (Root-Bernstein *et al.*, 1998) y si los modelos donde se observa su cumplimiento son representativos como para establecerlos como una regla general.

El empleo de la teoría del reconocimiento molecular, para predecir interacciones proteína-proteína en nuestro grupo de trabajo, ha sido de gran utilidad. De este modo se pudo predecir la interacción entre el lazo 2 de la toxina Cry1Ab con una de las regiones del receptor Bt-R1 (Gomez *et al.*, 2002). Así mismo, fue posible predecir que el anticuerpo scFv73 y la región HITDTNN del receptor Bt-R1 interactúan con las mismas regiones de la toxina Cry1Ab (Gomez *et al.*, 2002).

OBJETIVOS

En los años previos a que comenzara el trabajo que se describe en esta tesis, nuestro grupo de investigación, utilizando el despliegue en fagos como herramienta, logró identificar un epítoto clave involucrado en la interacción toxina-receptor para toxinas Cry1A (Gómez *et al.*, 2001). Así, se identificó un anticuerpo en formato de scFv (scFv73) capaz de inhibir la interacción de las toxinas Cry1A con uno de sus receptores presente sobre el intestino del lepidóptero *M. sexta* (proteína tipo caderina de 210 kDa) (Gómez *et al.*, 2001).

Este anticuerpo scFv73, es capaz de disminuir en un 50% la toxicidad de la toxina Cry1Ab hacia larvas de *M. sexta* (Gomez *et al.*, 2001) y promueve la formación de la forma oligomérica de la toxina, la cual es responsable de la inserción de la toxina en membranas de larvas de *M. sexta* (^aGómez *et al.*, 2002), mimetizando la actividad del receptor. Por otra parte, se demostró que la interacción del anticuerpo scFv73 ocurre a través del lazo 2 del dominio II de la toxina (^bGómez I *et al.*, 2002). Este resultado confirma la importancia de este dominio en la interacción de toxinas Cry con sus receptores.

El desarrollo de esta tesis se basa en la hipótesis de que las regiones lazos que conectan las hojas β del dominio II de las toxinas Cry, están involucradas en la interacción de dichas toxinas con sus receptores ubicados sobre la región apical del intestino de los insectos blanco.

Durante nuestro trabajo nos propusimos como objetivo principal estudiar la interacción de la toxina Cry11Aa de Bti, descrita como la más activa contra *A. aegypti*, con el intestino de larvas de *A. aegypti*. Esto con vistas a determinar él o los receptores involucrados con la interacción de la toxina así como los epítotos de la toxina que participan en dicha interacción.

Para responder a nuestros objetivos generales, se trazaron objetivos particulares específicos. Estos objetivos incluyeron la predicción de la estructura terciaria de la toxina Cry11Aa, para ubicar las posibles regiones lazos y β expuestas del dominio II, a fin de sintetizar péptidos correspondientes a dichas regiones. Los péptidos sintéticos involucrados en la interacción toxina-receptor, fueron caracterizados empleando como metodologías

fundamentales ensayos de competencia de la unión de Cry11Aa biotinada a las VMMA y despliegue en fagos. De esta manera pudimos identificar regiones sobre la toxina Cry11Aa importantes para la interacción con uno de sus receptores funcionales sobre el epitelio intestinal de larvas de *A. aegypti*.

El papel de las proteínas ALP y APN ancladas por GPI, como posibles receptores para la toxina Cry11Aa, fue determinado por análisis de la actividad enzimática de las proteínas purificadas por cromatografía de afinidad. La localización del receptor ALP fue descrita mediante el empleo de técnicas de inmunolocalización.

Los resultados obtenidos, así como las técnicas empleadas se describen ampliamente en los apéndices I y II.

CONCLUSIONES GENERALES

El mecanismo de acción general de las toxinas Cry, ha sido ampliamente estudiado. Se conoce que una vez que el insecto blanco ingiere la bacteria, los cristales son solubilizados en el intestino. Para esto son necesarias características específicas de pH y condiciones reductoras. Una vez solubles, las protoxinas liberadas son procesadas por medio de proteasas de tipo tripsina y quimotripsina y las toxinas activas se unen a receptores específicos que se encuentran sobre el epitelio intestinal. La unión al receptor desencadena una serie de eventos que conllevan a la inserción en membranas y la formación de poros líticos que conducen a la muerte del insecto.

Para el caso de toxinas Cry1A, activas contra insectos lepidópteros, se han descrito tres receptores funcionales. Los dos primeros en ser identificado fueron proteínas tipo caderina de alto peso molecular y varias isoformas de proteínas aminopeptidasa-N ancladas por GPI. Durante muchos años diferentes grupos trataron de demostrar la importancia de cada uno de estos dos tipos de receptores con el objetivo de definir cual constituía el receptor funcional (Gahan *et al.*, 2001; Morin *et al.*, 2003; Gill and Ellar, 2002; Rajagopal *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos sugieren la participación de ambos tipos de proteínas.

Evidencias experimentales obtenidas en nuestro laboratorio, han demostrado que durante el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ab, ocurren uniones secuenciales a ambos tipos de receptores, los cuales se encuentran ubicados sobre regiones de la membrana espacialmente separadas. En este sentido los resultados sugieren, que la toxina monomérica se une a un primer receptor tipo caderina y esta unión induce un cambio conformacional. Como consecuencia la toxina expone un sitio de corte proteolítico y las proteasas eliminan la hélice $\alpha 1$. El corte de esta región de aproximadamente 28 amino ácidos, deja expuestas regiones hidrofóbicas, lo cual provoca la formación de una estructura oligomérica compuesta probablemente por cuatro subunidades monoméricas (Gómez *et al.*, 2002). El oligómero formado pierde afinidad por el receptor tipo caderina, e interactúa con alta afinidad con el segundo receptor aminopeptidasa-N. Este receptor conduce al oligómero a microregiones de la membrana, donde se inserta y crea poros líticos que conducen a la muerte del insecto (figura 7).

La hipótesis anterior está apoyada por evidencias experimentales que muestran, que la estructura de pre-poro se inserta de manera más eficiente en VMMA, obtenidas a partir de intestinos de larvas de *M. sexta*. De esta manera se forman canales estables, con una alta probabilidad de encontrarse en una configuración abierta (Rausell *et al.*, 2004). La forma oligomérica de la toxina es activa en ensayos de toxicidad *in vivo* y es 200 veces más afín por el receptor APN que el monómero (Bravo *et al.*, 2004).

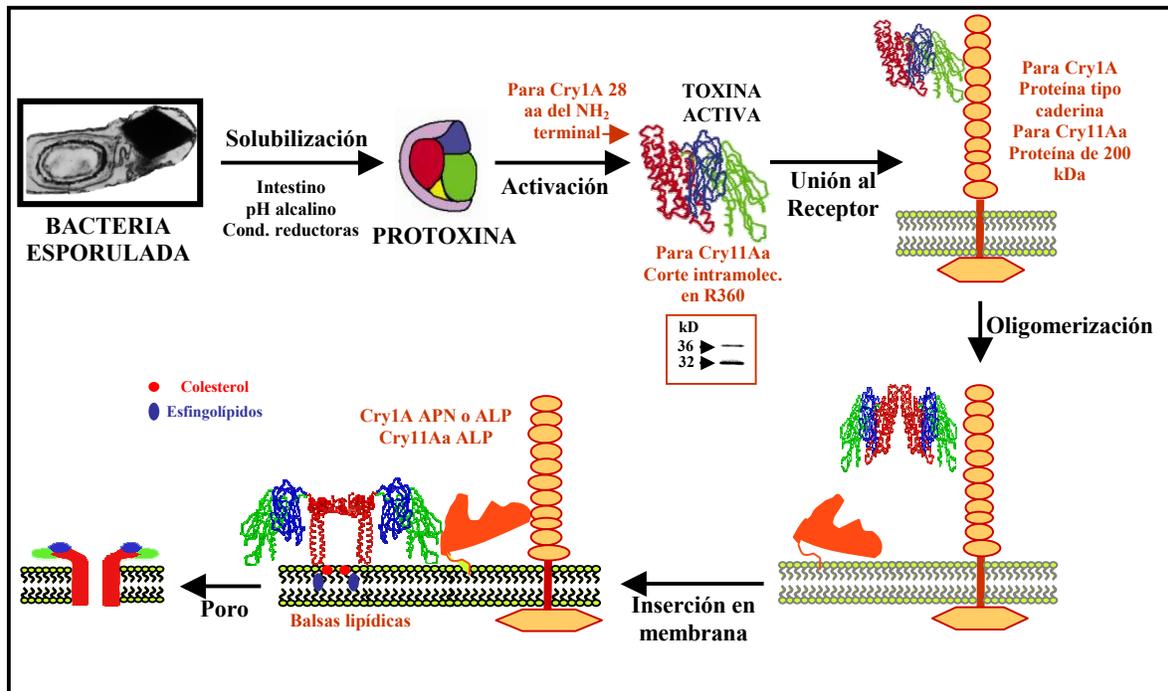


Figura 7. Mecanismo de acción general de las toxinas Cry. Particularidades reportadas para toxinas Cry con actividad contra insectos lepidópteros. Comparación con insectos dípteros.

Una ALP anclada por GPI, constituye la tercera molécula receptora descrita para insectos lepidópteros. La misma fue encontrada en *H. virescens* (Jurat-Fuentes and Adang, 2004) y puede tener el papel propuesto para la APN en *M. sexta*. Sin embargo, no existe ningún reporte que demuestre esta hipótesis.

Para el caso de toxinas Cry con especificidad para otros órdenes de insectos, poco se conoce acerca de los receptores involucrados en la interacción de la toxina con las células intestinales. En el año 2002 Buzdin y colaboradores reportaron los primeros resultados, que mostraban a dos proteínas de 62 y 65 kDa como moléculas de unión sobre las VMMA de larvas de *A. aegypti*, para las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa de Bti (Buzdin *et al.*, 2002). Sin embargo la identidad de dichas proteínas y su papel como moléculas receptoras, no fue

analizada. Por otra parte han sido descritas dos APN, presentes sobre el intestino de larvas de *A. aegypti* (Pootanakit *et al.*, 2003) y una anhidrasa carbónica, que colocaliza con las regiones del intestino a las cuales se unen toxinas Cry en el mismo insecto (Seron *et al.*, 2004). Sin embargo su participación como receptores para dichas toxinas no ha sido descrito. Finalmente una α -glicosidasa (Cpm1) constituye el receptor funcional, en larvas de *C. pipiens*, para la toxina binaria producida por *B. sphaericus* (Darboux *et al.*, 2001).

Los datos reportados en este trabajo demuestran que la proteína de 65 kDa, descrita previamente como una proteína de unión para Cry11Aa, es una APL anclada por GPI a las membranas de las células intestinales de larvas del mosquito *A. aegypti*. Este constituye el primer reporte acerca de un receptor para toxinas Cry con actividad contra insectos dípteros. Además, se caracterizó una proteína transmembranal de alto peso molecular (200 kDa) que interactúa con Cry11Aa. Por último fue caracterizada una de las regiones sobre la toxina, involucrada en la interacción con la ALP.

Por otra parte, datos no publicados obtenidos en nuestro laboratorio, sugieren la existencia de una estructura de pre-poro para la toxina Cry11Aa (Pérez y Sánchez, comunicación personal). Estas evidencias sugieren, que en el mecanismo de acción de toxinas Cry activas contra insectos dípteros, también ocurre la formación de una estructura oligomérica. Este hecho, sumado a la presunta participación de más de un receptor, sugiere que de modo general, el mecanismo de acción de toxinas Cry es reiterativo. Al igual que ocurre para toxinas Cry activas contra insectos lepidópteros, en este caso, el receptor de alto peso molecular podría estar a cargo del contacto previo de la toxina Cry11Aa con las membranas del insecto blanco. Este primer contacto podría desencadenar una serie de cambios conformacionales sobre la toxina, que condujeran a la formación de oligómeros que interactuen con la proteína ALP. La proteína ALP anclada por GPI, podría estar ubicada en regiones de microdominios de membrana, en las cuales ocurra la inserción tal como sucede con la APN de *M. sexta*.

Los resultados obtenidos en esta tesis son de gran importancia para ayudar a esclarecer el mecanismo de acción general de toxinas Cry y en particular de toxinas Cry activas contra insectos dípteros. Los mismos sugieren que de modo general las toxinas Cry actúan con el

intestino de su insecto blanco a través de un proceso que involucra varios pasos y en el cual participan más de una molécula receptora (figura 7).

PERSPECTIVAS

Resultados preliminares

Una vez identificada la ALP como un posible receptor para Cry11Aa, tratamos de secuenciar la región amino de la proteína para confirmar su identidad. Los esfuerzos realizados en este sentido fueron del todo infructuosos, pues la región amino de la misma se encuentra bloqueada.

Análisis de secuencia de la ALP

Experimentos realizados en el laboratorio del Dr. Sarjeet Gill, confirman la existencia de una fosfatasa alcalina en el intestino de larvas del mosquito *A. aegypti*, que interactúa con la toxina Cry11Aa. La interacción de Cry11Aa-ALP fue observada empleando ensayos de unión a ligando. La secuencia de la fosfatasa alcalina aislada y que interactúa con Cry11Aa se muestra en la figura 8.

```

MYLLRMFAV FVLLSSVLRASRG NPSQEFVQYLTTTPSDHVHPPDRDGDGDLNRKKR
LISASDYEETAQFWNI GAQLKLEQLLKRKNFNKAKNVIFFLGDGMSIPTLAASMYLG
QKQGHSGEETQLSFEEFPDVGLVKTYCVDKQVAD SACSATAYLCGVKANYATIGVTAAV
KYNNTTGNDPKNHVHSIMSWAQAAGKATGIVTTTRVTHAS PAGTYAHVSN EHECDAD
ILAQNADPNDCQDIASQLVRNPNPKNLKVIILGGRRKFTPNTEKDPGKPGQRMGPNL
ISEWYYSKPLGSARYVTNKQGLMGINFNETEYLMGLEFNYDHMKYHMDSNPKEDPTLSDL
TYAAIKTLEKNKAGFVLFV EGGKIDLAH HETKARKSLDETQVLSAVQLATQYTNSSDDT
LILVTAD HAHTMSMAGYSKRGHDI LGVSGSSHDKGKSPYTTLSYANGPGGPSLTDGRRL
NITEEMLTNKDFQYPKLVPLKYETH HGGDDVALFAYGPWSHLF SGMYEQNVIPIIGYAA
CIGSGLTACIG

```

Figura 8. Análisis de secuencia de la ALP anclada por GPI de *A. aegypti*. La figura muestra la secuencia de una ALP aislada a partir de células intestinales de larvas de *A. aegypti*. En azul se subraya el péptido señal de la proteína. En rojo subrayado los residuos catalíticos y sin subrayar los residuos de unión a metales. En verde se señala una región predicha como posible región de interacción con el lazo $\alpha 8$ de la toxina Cry11Aa (ver perfiles de hidropatía).

El análisis de la secuencia muestra que la ALP posee un peso molecular estimado de 60 kDa y conserva todos los sitios de unión a metales (residuos en rojo) que se encuentran en otras fosfatasas alcalinas. Además, posee un péptido señal (marcado en azul y subrayado) que puede facilitar la exportación de la ALP fuera de la célula y se puede

predecir que constituye una proteína anclada por GPI. Este resultado nos permite especular que, la ALP encontrada por el grupo del Dr. Sarjeet Gill podría coincidir con la proteína de unión caracterizada en este trabajo.

Finalmente, el análisis de la secuencia revela la existencia de una asparagina en la región amino terminal (marcada en amarillo) que provoca el bloqueo de la reacción de proteólisis empleada para la secuenciación. Este hecho explica porque no pudimos determinar la secuencia de la proteína.

Análisis de los perfiles de hidropatía de la ALP

Con el objetivo de predecir las posibles regiones importantes para la interacción de la ALP con la toxina Cry11Aa, se realizó un análisis de los perfiles de hidropatía de la proteína. La comparación de la secuencia de la ALP con la región $\alpha 8$ de la toxina Cry11Aa y el péptido desplegado en el fago P1.BBMV, muestra una región con perfiles de hidropatía complementarios sobre la ALP. Esta región además, guarda similitud con el péptido desplegado el el fago P5.tox (figura 9). La región hipotetizada se muestra en la figura 8 (en verde) y su participación será demostrada por ensayos complementarios.

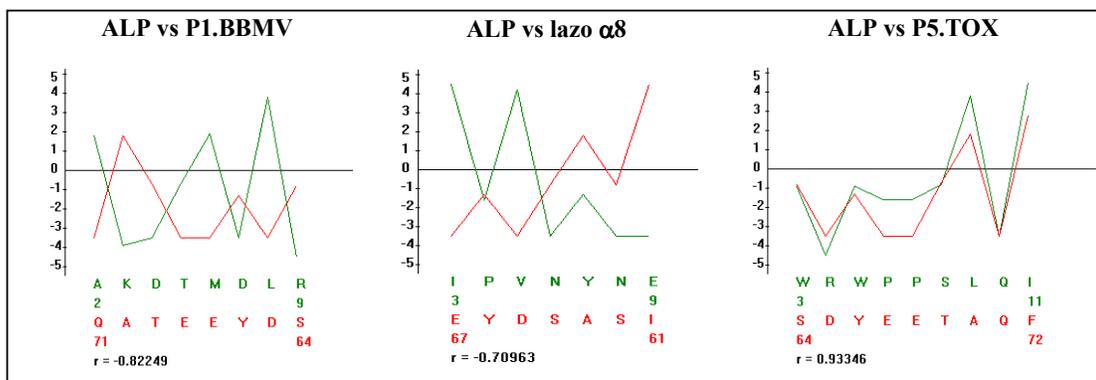


Figura 9. Análisis de los perfiles de hidropatía

Propuestas para la continuación del trabajo

Tomando como base estos resultados preliminares nos proponemos la caracterización de la ALP de secuencia conocida, para demostrar que es la misma proteína identificada durante la realización de este trabajo. La proteína será clonada en un vector adecuado para su expresión como proteína soluble. Se llevarán a cabo ensayos de unión por ELISA con la proteína Cry11Aa para determinar la constante de afinidad de la unión de ambas proteínas. Además se incluirá un análisis con la toxina Cry4B de Bti, para determinar si realmente comparte el mismo receptor que Cry11Aa.

Por otra parte, se empleará el péptido $\alpha 8$ y los fagos P1.BBMV y P5.tox como competidores de la unión de Cry11Aa a la ALP, para confirmar la participación de esta región en la interacción de la toxina con su receptor. Este mismo análisis se realizará para identificar otras regiones sobre el dominio II, que pudiesen participar en la interacción toxina-receptor. Para esto pretendemos caracterizar la participación de otras regiones de la toxina, las cuales parecen ser importantes para la interacción con el receptor y que fueron previamente identificadas en este trabajo ($\beta 4a$ - $\beta 4b$ y lazo 3).

Paralelamente se analizará si la proteína ALP interactúa con alguna región del dominio III de la toxina, empleando un arreglo de péptidos sintéticos sobrelapantes, correspondientes a esta región, adheridos a membrana.

En adición, se analizarán proteínas ALP mutantes para determinar las regiones de la proteína que participan en la interacción con las toxinas Cry11Aa y Cry4B. Para construir dichas mutantes se tomará la región predicha por hidropatía y se emplearán fragmentos sobrelapantes de 450 pb de la ALP. De esta forma se pretende expresar de manera independiente fragmentos de la proteína para determinar la región de la misma involucrada en la interacción con la toxina Cry11Aa y en particular con el lazo $\alpha 8$.

REFERENCIAS

- Abdullah MAF, Valaitis AP and Dean DH. 2006. Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry* **7**, 16.
- Atsumi S, Mizuno E, Hara H, Nakanishi K, Kitami M, Miura N, Tabunoki H, Watanabe A and Sato R. 2005. Location of the *Bombix mori* Aminopeptidase N type 1 binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3966-3977.
- Barbas CF 3rd, Bjorling E, Chiodi F, Dunlop N, Cababa D, Jones TM, Zebedee SL, Persson MA, Nara PL, Norrby E *et al.* 1992. Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9339-43.
- Barbas CF 3rd, Kang AS, Lerner RA & Benkovic SJ. 1991. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 7978-7982.
- Beegle CC and Yamamoto T. 1992. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *Can. Entomol.* **124**: 587-616.
- Blalock JE. 1990. Complementary of peptides specified by "sense" and "antisense" strands of DNA. *Trends Biotech.* **8**, 140-144.
- Blalock JE. 1999. On the evolution of ligands: did peptides functionally precede metals and small organic molecules?. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 513-518.
- Blaustein L and Margalit J. 1991. Indirect effects of the fairy shrimp, *Branchipus schaefferi* and two ostracod species on *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* induce mortality in mosquito larvae. *Hydrobiol.* **212**, 67-76.
- Boquet D, Dery O, Frobert Y, Grassi J and Counrad JY. 1995. Is hydrophobic complementary involved in antigen-antibody binding?. *Mol. Immunol.* **32**, 303-308.
- Boonserm P, Davis P, Ellar DJ and Li J. 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* **348**, 363-382.
- Boonserm P, Mo M, Angsuthanasombat Ch and Lescar J. 2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Angstrom resolution. *J. Bacteriol.* **188**, 3391- 3401.

- Bravo A, Gómez I, Conde J, Muñoz-Garay C, Sánchez J, Miranda R, Zhuang M, Gill SS. and Soberón M. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochem Biophys Acta*. **1667**, 38-46.
- Bravo A, Sanchez J, Kouskoura T, Crickmore N. 2002. N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. *J. Biol. Chem.* **277**, 23985-87.
- Bravo A, Hendrickx K, Jansens S and Peferoen M. 1992. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Invertebr. Pathol.* **60**, 247-254.
- Breitling, F., Dubel, S., Seehaus, T., Klewinghaus, I. & Little, M. 1991. A surface expression vector for antibody screening. *Gene* **104**, 147-153.
- Broadwell AH and Baumann P. 1986. Sporulation-associated activation of *Bacillus sphaericus* larvicidal toxins *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 758-764.
- Broadwell AH and Baumann P. 1987. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1333-1337.
- Broadwell AH, Baumann L and Baumann P. 1990. Larvicidal properties of the 42 and 51 kilodalton *Bacillus sphaericus* proteins expressed in different bacterial hosts: evidence for a binary toxin. *Curr. Microbiol.* **21**, 361-366.
- Burton SL, Ellar DJ, Li J and Derbyshire DJ. 1999. N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J. Biol. Biol.* **287**, 1011-1022.
- Butko P. 2003. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** (5), 2415–2422.
- Buzdin, A. A., Revina, L. P., Kostina, L. I., Zalunin, I. A. and Chestukhina, G. G. (2002) Interaction of 65- and 62-kD proteins from the apical membranes of the *Aedes aegypti* larvae midgut epithelium with Cry4B and Cry11A endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. *Biochemistry (Moscow)* **67**, 540–546.
- Cabello G, Juarranz A, Botella LM and Calaf GM. 2003. Organophosphorous pesticides in breast cancer progression. *J. Submicrosc Cytol Pathol.* **35**, 4 9.

- Chan SW, Thanabalu T, Wee BY and Porter AG. 1996. Unusual amino acid determinants of host range in the Mtx2 family of mosquitocidal toxins. *J. Biol. Chem.* **271**, 14183-87.
- Chang C, Yu YM, Dai SM, Law SK and Gill SS. 1993. High-level CryIVD and CytA gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 815-821.
- Charles JF, Silva-Filha MH, Nielsen-Leroux C. 2000. Mode of action of *Bacillus sphaericus* on mosquito larvae: incidence on resistance. *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application*. London: Kluwer.
- Charles JF, Silva-Filha MH, Nielsen-Leroux C, Humphreys MJ and Berry C. 1997. Binding of the 51- and 42-kDa individual components from the *Bacillus sphaericus* crystal toxins on mosquito larval midgut membranes from *Culex* and *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae). *FEMS Microbiol. Lett.* **156**: 153-59.
- Chen J, Brown MR, Hua G, Adang MJ. 2005. Comparison of the localization of *Bacillus thuringiensis* Cr1A δ -endotoxins and their binding proteins in larval midgut of tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Cell and Tissue Research.* **321**(1), 123-1299.
- Chen XJ, Curtis A, Alcantara E and Dean DH. 1995. Mutations in Domain I of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIAb reduce the irreversible binding to toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **270**, 6412-6419.
- Chen XJ, Lee MK and Dean DH. 1993. Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombix mori* midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9041-9045.
- Chiou CK, Davidson EW, Thanabalu T, Porter AG and Allen JP. 1999. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the 51 kDa protein of the mosquito-larvicidal binary toxin from *Bacillus sphaericus*. *Acta Crystallogr. D.* **55**, 1083- 85.
- Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD and Winter G. 1991. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**, 624-628.
- Cohen S. 1991. Encapsulation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in polymeric formulations that protects the toxin crystals from degradation, radiation and adsorption. M.Sc. thesis. Ben-Gurion University of the Negev, Be'er-Sheva, Israel.

- Crikmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J and Dean DH. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 807-813.
- Dai SM. & Gill SS. 1993. *In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. *Ins. Biochem. Mol. Biol.* **23**, 273-283.
- Darboux I, Nielsen-Leroux C, Charles JF and Pauron D. 2001. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **31**, 981-990.
- Davidson EW, Oei C, Meyer M, Bieber AL, Hindley J and Berry C. 1990. Interaction of the *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal proteins. *Can. J. Microbiol.* **36**, 870-78.
- Dean DH, Rajamohan F, Lee MK, Wu SJ, Chen J, Alcántara E and Hussain SR. 1996. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis: a minireview. *Gene* **179**, 111-117.
- de Maagd RA, Bakker PI, Masson L, Adang MJ, Sangadala S, Stickema W and Bosch D. 1999. Domain III of the *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin Cry1Ac is involved in binding to *Manduca sexta* brush border membranes and to its purified aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* **31**, 463-471.
- de Maagd, R.A., Bravo, A. and Crickmore, N. (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* **17**, 193–199.
- de Maagd RA, Kwa MSG, van der Klei H, Yamamoto T, Schipper B and Vlak JM. 1996. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins Cry1Ab results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1537-1543.
- de Maagd RA, Weemen-Hedricks M, Stiekema W and Bosch D. 2000. *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-CryC hybrids. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1559-1563.
- Doyle, D. A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M. & MacKinnon, R. 1996. Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* **85**, 1067-1076.

- English LH and Readdy TL. 1989. δ endotoxin inhibits a phosphatase in midgut epithelial membranes of *Heliothis virescens*. *Insect Biochem.* **19**, 145-152.
- Fedhila S, Nel P, Lereclus D. 2002. The InhA2 metaloprotease of *Bacillus thuringiensis* strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via the oral route. *J. Bacteriol.* **184**, 3296-3304.
- Feitelson JS, Payne J and Kim L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology* **10**, 271-75
- Gahan LJ, Gould F and Heckel DG. 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science.* **293**, 857-860.
- Galitsky N, Cody V, Wojtczak A, Ghosh D, Luft JR, Pangborn W and English L. 2001. Structure of insecticidal bacterial d-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr.* **D57**, 1101-1109.
- Garrard, L. J., Yang, M., O'Connell, M. P., Kelley, R. F. & Henner, D. J. 1991. Fab assembly and enrichment in a monovalent phage display system. *Biotechnology* (N Y) **9**, 1373-1377.
- Ge AZ, Rivers D, Milne R and Dean DH. 1991. Functional domain of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: refinement of *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* specificity domains on CryIA(c). *J. Biol. Chem.* **266**, 17954-17958.
- Ge AZ, Shivarova NI and Dean DH. 1989. Localization of the *Bombix mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4037-4041.
- Georghiou GP and Wirth MC. 1997. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1095-1101.
- Gill M, Ellar DJ. 2002. Transgenic *Drosophila* reveals a functional in vivo receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. *Ins Mol Biol.* **11**, 619-625.
- Guillet P, Kurstack DC, Philippon B and Meyer R. 1990 in *Bacterial Control of Mosquitoes and Blackflies*, eds. De Barjac H and Sutherland DJ (Rutgers Univ. Press, Piscataway, NJ), pp. 187-190.

Goldberg LJ and Margalit J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito News* . **37**: 355–358.

Gómez I, Dean DH, Bravo A, Soberón M. 2003. Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: Two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R₁ receptor interact with loops α -8 and 2 in domain II of Cyl1Ab toxin. *Biochemistry* **42**, 10482-10489.

^bGomez, I., Miranda-Rios, J., Rudino-Pinera, E., Oltean, D. I., Gill, S. S., Bravo, A. & Soberon, M. (2002). Hydrophobic complementarity determines interaction of epitope (869)HITDTNNK(876) in *Manduca sexta* Bt-R(1) receptor with loop 2 of domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *J Biol Chem* **277**, 30137-43

Gomez, I., Oltean, D., Gill, S.S., Bravo, A. and Soberon, M. (2001) Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. *J. Biol. Chem.* **276**, 28906–28912.

^aGomez I., Sanchez, J., Miranda, R., Bravo, A. & Soberon, M. (2002). Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett* **513**, 242-6.

Grabs D, Slepnev VI, Songyang Z, David C, Lynch M, Cantley LC & De Camilli P. 1997. The SH3 domain of amphiphysin binds the proline-rich domain of dynamin at a single site that defines a new SH3 binding consensus sequence. *J Biol Chem* **272**, 13419-13425.

Griffiths AD, Malmqvist M, Marks JD, Bye JM, Embleton MJ, McCafferty J, Baier M, Holliger KP, Gorick BD, Hughes-Jones NC *et al.* 1993. Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *Embo J* **12**, 725-734.

Griffiths AD, Williams SC, Hartley O, Tomlinson IM, Waterhouse P, Crosby WL, Kontermann RE, Jones PT, Low NM, Allison TJ & *et al.* 1994. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *Embo J* **13**, 3245-3260.

Griffiths JS, Haslam SM, Yang T, Garczynski SF, Mulloy B, Morris H, Cremer PS, Dell A, Adang MJ and Aroian RV. 2005. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science* **307**, 922-925.

- Griffitts JS, Huffman DL, Whitacre JL, Barrows BD, Marroquin LD, Muller R, Brawn JR, Hennes T, Esko JD, Aroian RV. 2003. Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions. *J. Biol. Chem.* **278**, 45594-45602.
- Grochulski P, Masson L, Borisova S, Pusztai-Carey M, Schwartz JL, Brousseau R & Cygler M. 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* **254**, 447-464.
- Guerchicoff A, Ugalde RA and Rubinstein CP. 1997. Identification and characterization of a previously undescribed *cyt* gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2716-2721.
- Herrero S, Gechev T, Bakker PL, Moar WJ, de Maagd RA. 2005. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four aminopeptidase N genes. *BMC Genomics* **6**, 96-106.
- Hodgman TC and Ellar DJ. 1990. Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins determined by computational analysis. *DNA Seq.* **1**, 97-106.
- Hofmann C, Vanderbruggen H, Hofte H, Van Rie J, Jansens S & Van Mellaert H. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 7844-8.
- Höfte H and Whiteley R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**, 242-255.
- Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P & Winter G. 1991. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res* **19**, 4133-4137.
- Hoogenboom HR and Winter G. 1992. By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **227**, 381-388.
- Hussian SRA, Aronson AI and Dean DH. 1996. Substitution of residues on the proximal side of Cry1A *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins affects irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**, 8-14.

- Jackson Yap J, Barry C. 1991. Cloning, sequencing and expression of a gene encoding a 100 kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. *J. Bacteriol.* **173**, 2776-85.
- Jenkins JL, Lee MK, Valaitis AP, Curtiss A y Dean DH. 2000. Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to Gypsy moth aminopeptidase N receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 14423-14431.
- Jurat-Fuentes JL and Adang MJ. 2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3127-3135.
- Kay BK, Kasanov J, Knight S & Kurakin A. 2000. Convergent evolution with combinatorial peptides. *FEBS Lett* **480**, 55-62.
- Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA and Finlay BB. 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Transfers Its Receptor for Intimate Adherence into Mammalian Cells. **91**(4), 511-20.
- Knight P, Crickmore N and Ellar DJ. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* **11**, 429-436.
- Knowels BH. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Adv. Insect. Physiol.* **24**, 275-308.
- Knowles BH, Blatt MR, Tester M, Horsnell JM, Carroll J, Menestrina G and Ellar DG. 1989. A cytolytic delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* **244**, 259-262.
- Komano T, Yamagiwa M, Nishimoto T, Yoshisue H, Tanabe K, Sen K and Sakai H. 1998. Activation process of the insecticidal proteins CryIVA and CryIVB produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Entomol.* **32**, 185-198.
- Koppenhöfer AM, Wilson M, Brown I, Kaya HK and Gaugler R. 2000. Biological control agents for white grubs (Coleoptera: scarabaeidae) in anticipation of an establishment of the Japanese beetle in California. *J. Econ Entomol.* **93** (1), 71-80.
- Lee MK, Young BA and Dean DH. 1995. Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 306-312.

- Lereclus D, Agaisse H, Gominet S, Salameitou S and Sanchis V. 1996. Identification of a gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *J. Bacteriol.* **178**, 2749-2756.
- Li JP, Carroll J & Ellar DJ. 1991. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* **353**, 815-821.
- Li JP, Derbyshire DJ, Promdonkoy B and Ellar DJ. 2001. Structural implications for the transformation of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 571-577.
- Li JP, Koni A and Ellar DJ. 1996. Structure of the mosquitocidal delta-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* ssp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J. Mol. Biol.* **257**: 129–152.
- Liang Y, Patel SS and Dean DH. 1995. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA d-endotoxins to gypsi moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *J. Biol. Chem.* **270**, 24719-24724.
- Linn H, Ermekova KS, Rentschler S, Sparks AB, Kay BK & Sudol M. 1997. Using molecular repertoires to identify high-affinity peptide ligands of the WW domain of human and mouse YAP. *J. Biol Chem* **378**, 531-537.
- Liu XS and Dean DH. 2006. Redesigning *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin into a mosquito toxin. *Protein Engineering Design & Selection* **19**, 107-111.
- Liu JW, Porter AG, Wee BY, Thanabalu T. 1996. New gene from nine *Bacillus sphaericus* strains encoding highly conserved 35.8 kilodalton mosquitocidal toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2174-76.
- Margalith Y and Ben-Dov E. 2000. Insect Pest Management: Techniques for Environmental Protection (Rechcigl, J.E. and Rechcigl, N.A., Eds.), p. 243, CRC Press, Boca Raton.
- Margalit J and Bobroglo H. 1984. The effect of organic materials and solids in water on the persistence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ser. H-14. *Z. Angew. Entomol.* **97**, 516-520.
- Marks J.D, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD & Winter G. 1991. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* **222**, 581-97.

- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J. 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, 552-554.
- McNall RJ, Adang MJ. 2003. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* **33**, 999-1010.
- Morin S, Biggs RW, Shriver L, Ellers-Kirk C, Higginson D, Holley D, Gahan D, Heckel DG, Carriere Y, Dennehy TJ, Brown JK, Tabashnik BE. 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 5004-5009.
- Morse RJ, Yamamoto T, Stroud RM. 2001. Structure of Cry2Aa suggests an un-spected receptor binding epitope. *Structure* **9**, 409-417.
- Moulard M, Phogat SK, Shu Y, Labrijn AF, Xiao X, Binley JM, Zhang MY, Sidorov IA, Broder CC, Robinson J, Parren PW, Burton DR and Dimitrov DS. 2002. Broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal Fab selected for binding to gp120-CD4-CCR5 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6913-6918.
- Munro S. 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* **115**, 377-388.
- Nagamatsu Y, Koike T, Sasaki K, Yoshimoto A and Furukawa Y. 1999. The caderin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal. *FEBS Lett.* **460**, 385-390.
- Nicolas L, Nielsen-Leroux C, Charles JF and Delecluse A. 1993. Respective role of the 42- and 51-kDa componentes of *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **106**: 275-79.
- Nielsen-Leroux C and Charles JF. 1992. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranas from mosquito larvae. *Eur. J. Biochem.* **210**, 585-90.
- Oei C, Hindley J and Berry C. 1992. Binding of purified *Bacillus sphaericus* binary toxin and its deletion derivatives to *Culex quinquefasciatus* gut: elucidation of functional binding domains. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1515-26.
- Ohana BJ, Margalit J and Barak Z. 1987. Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* under simulated field conditions. *Appl. Envirom. Microbiol.* **53**, 828- 831.

- Oltean DI, Pullikuth AK, Lee H-K, Gill SS. 1999. Partial purification and characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin receptor A from *Heliothis virescens* and cloning of the corresponding cDNA. *Appl Environ. Microbiol.* **65**, 4760-476.
- Parker MW, Buckley JT, Postma JPM, Tucker AD, Leonard K, et al 1994. Structure of the *Aeromonas* toxin proaerolysin in its water-soluble and membrana-channel states. *Nature* **367**, 292-95.
- Partridge MR and Berry C. 2002. Insecticidal activity of the *Bacillus sphaericus* Mtx1 toxin against *Cironomus riparus*. *J. Invertebr. Pathol.* **79**, 135-36.
- Picard C, Ronco P, Mollier P, Yao J, Baudouin B, Geniteau-Legendre M and Verroust P. 1986. Epitope diversity of angiotensin II analysed with monoclonal antibodies. *Immunol.* **57**, 19-24.
- Pootanakit K, Angsuthanasombat C and Panyin S. 2003. Identification of two isoforms of aminopeptidase N in *Aedes aegypti* larval midgut. *J. Biochem. Mol. Biol.* **36**, 508-513.
- Porter AG, Davidson EW and Liu JW. 1993. Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. *Microbiol. Rev.* **57**, 838-861.
- Promdonkoy B and Ellar DJ. 2000. Membrane pore architecture of a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* **350**, 275-282.
- Promdonkoy B and Ellar DJ. 2005. Structure-function relationships of a membrane pore forming toxin revealed by reversion mutagenesis. *Mol. Membr. Biol.* **22**, 327-337.
- Pusztai M, Fast P, Gringorten L, Kaplan H, Lessard T and Carey PR. 1991. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochem. J.* **273**, 43- 47.
- Rajagopal R, Sivakumar S, Agrawal N, Malhotra P, Bhatnagar RK. 2002. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J. Biol. Chem.* **277**, 46849-46851.
- Rajamohan F, Alzate O, Cottrill JA, Curtiss A and Dean DH. 1996. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: mutations at domain II of Cry1Ab enhance receptor affinity and toxicity towards gypsy moth larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **93**, 14338-14343.

- Rajamohan F, Lee MK and Dean DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: Molecular mode of action. *Prog. Nucl. Ac. Res.* **60**, 1-27.
- Rang C, Lacey LA and Frutos R. The crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni* display a synergistic activity against the codling moth, *Cydia pomonella*. *Curr. Microbiol.* **40**, 200-4.
- Rashed SS and Mulla MS. 1989. Factors influencing ingestion of particulate materials by mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **26**, 210-216.
- Rausell C, Muñoz-Garay C, Miranda-CassoLuengo R, Gómez I, Rudiño-Piñera E, Soberón M and Bravo A. 2004. Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrana-insertion intermediate. *Biochemistry* **43**, 166-174.
- Ravoahangimalala O, Charles JF and Shchoeller-Raccaud J. 1993. Immunological localization of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* toxins in midgut cells of intoxicated *Anopheles gambiae* larvae Diptera: Culicidae. *Res. Microbiol.* **144**, 271-278.
- Regis L, da Silva SB and Melo-Santos MAV. 2000. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **95**, 207-210.
- Rojas G, Almagro JC, Acevedo B and Gavilondo JV. 2002. Phage antibody fragments library combining a single human light chain variable region with immune mouse heavy chain variable regions. *J Biotechnol* **94**, 287-298.
- Root-Bernstein RS and Holsworth DD. 1998. Antisense peptides: A critical mini-review. *J. Theor. Biol.* **190**, 107-119.
- Rupar MJ, Donovan WP, Chu CR, Pease E, Tan Y, et al. 2000. *PCT Intl. Appl.* WO 0066742.
- Rydel T, Sharamitaro J, Brown GR, Gouzov V, Seale J, et al. 2001. The crystal structure of a coleopteran insect-active binary Bt protein toxin complex at 2.5 Å resolution. *Presented at Annu. Met. Am. Crystallogr. Assoc.*, Los Angeles.
- Revina LP, Kostina LI, Ganushkina LA, Zalunin IA & Chestukina GG. 2004. Reconstruction of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry11A endotoxin from fragments corresponding to its N- and C-moieties restores its original biological activity. *Biochemistry (Moscow)* **69**, 181-187.

- Salcini AE, Confalonieri S, Doria M, Santolini E, Tassi E, Minenkova O, Cesareni G, Pelicci PG. & Di Fiore PP. 1997. Binding specificity and in vivo targets of the EH domain, a novel protein-protein interaction module. *Genes Dev* **11**, 2239-2249.
- Sangadala S, Walters SF, English LH and Adang MJ. 1994. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and $^{86}\text{Rb}^+ - \text{K}^+$ efflux *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **269**, 10088-10092.
- Schirmer J, Hieden HJ, Rodnina MV and Aktories K. 2002. Inactivation of the elongation factor Tu by mosquitoicidal toxin-catalyzed mono-ADP ribosylation. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4894-99.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR and Dean DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 775-806.
- Schwartz JL, Juteau M, Grochulski P, Cygler M, Prefontaine G, Brousseau R and Masson L. 1997. Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. *FEBS Lett.* **410**, 397-402.
- Schwartz JL, Potvin L, Coux F, Charles JF and Berry C, *et al.* 2001. Permeabilization of model lipid membranes by *Bacillus sphaericus* mosquitoicidal binary toxin and its individual components. *J. Membr. Biol.* **184**: 171-83
- Seron TJ, Hill J and Linser PJ. 2004. A GPI-linked carbonic anhydrase expressed in the larval mosquito midgut. *J Exp Biol* **207**, 4559-4572.
- Silva-Filha MH, Nielsen-Leroux C and Charles JF. 1997. Binding kinetics of *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush border membranes of *Anopheles* and *Culex* sp. mosquito larvae. *Eur. J. Biochem.* **247**: 754 -61.
- Silva-Filha MH, Nielsen-Leroux C and Charles JF. 1999. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29**: 711-21
- Smirnova TA, Minenkova IB, Orlova MV, Lecadet MM and Azizbekyan RR. 1996. The crystal-forming strain of *Bacillus laterosporus*. *Res. Microbiol.* **147**, 343-350.
- Smith, G. P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1317.

- Soderlind E, Strandberg L, Jirholt P, Kobayashi N, Alexeiva V, Aberg AM, Nilsson A, Jansson B, Ohlin M, Wingren C, Danielsson L, Carlsson R and Borrebaeck. 2000. Recombining germline-derived CDR sequences for creating diverse single-framework antibody libraries. *Nature Biotechnology*. **18**, 852- 856.
- Sowadski JM, Handschumacher MD, Murthy HM, Foster BA, Wyckoff HW. 1985. Refined structure of alkaline phosphatase from *Escherichia coli* at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **186**, 417- 433.
- Sparks AB, Rider JE, Hoffman NG, Fowlkes DM, Quillam LA & Kay BK. 1996. Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 1540-1544.
- Thanabalu T and Porter AG. 1996. A *Bacillus sphaericus* gene encoding a novel type of mosquitocidal toxin of 31.8 kDa. *Gene* **170**, 85-89.
- Struch JJ, Warren GW, Mullins MA, Nye GJ, Craig JA and Koziel MG. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5389-94.
- Vadlamudi RK, Weber E, Ji I, Ji TH & Bulla LA Jr. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **270**, 5490-5494.
- Valaitis AP, Jenkins JL, Lee MK, Dean DH and Garner KJ. 2001. Isolation and partial characterization of Gypsy moth BTR-270 and anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. *Arch. Ins. Biochem. Physiol.* **46**, 186-200.
- Ward ES, Ellar DJ and Chilcott CN. 1988. Single amino acid changes in the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin affect the toxicity and expression of the protein. *J. Mol. Biol.* **202**, 527–535.
- Waren G. 1997. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pest. In: Carozzi N, Koziel M (Eds.), *Advances in Insect Control: The role of Transgenic Plants*. Taylor and Francis, London, pp. 109-121.
- Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE & Hoogenboom HR. 1994. Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* **12**, 433-55.
- Winter G and Milstein C. 1991. Man-made antibodies. *Nature* **349**, 293-9.

- Wirth MC, Federici BA and Walton WE. 2000. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* synergizes activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1093-1097.
- ^bWirth MC, Walton WE and Federici BA. 2000. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* restores toxicity of *Bacillus sphaericus* against resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **37**, 401-407.
- Wolfersberger MG. 1990. The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. *Experientia.* **46**, 475-477.
- Wolfersberger MG, Chen XJ and Dean DH. 1996. Site-directed mutations in the third domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIAa affect its ability to increase the permeability of *Bombyx mori* midgut brush border membrane vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 279–282.
- Wu D and Chang FN. 1985. Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal. *FEBS Lett.* **190**, 232–236.
- Wu D, Johnson JJ and Federici BA. 1994. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* **13**, 965–972.
- Xie R, Zhuang M, Ross LS, Gomez I, Oltean DI, Bravo A, Soberon M and Gill SS. 2005. Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. *J. Biol. Chem.* **280** (9), 8416-25.
- Yamabhai, M., Hoffman, N. G., Hardison, N. L., McPherson, P. S., Castagnoli, L., Cesareni, G. & Kay, B. K. 1998. Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five Src homology 3 domains. *J Biol Chem* **273**, 31401-31407.
- Yamagiwa M, Esaki M, Otake K, Inagaki M, Komano T, Amachi T and Sakai H. 1999. Activation process of dipteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3464-3469.
- Yamagiwa M, Ogawa R, Yasuda K, Natsuyama H, Sen K, Sakai H. 2002. Active form of dipteran-specific insecticidal protein CryIIA produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **66** (3), 516-22.

- Yamagiwa M, Sakagawa K & Sakai H. 2004. Functional analysis of two processed fragments of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 523-528.
- Yu CG, Mullins MA, Warren GW, Koziel MG and Estruch JJ. 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelial cells of susceptible insects. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 532-536.
- Zhang X, Candas M, Griko NB, Taussig R and Bulla LA. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signalling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *PNAS USA* **103**, 9897-9902.
- Zhang J, Hodgman C, Krieger L, Schnetter W and Schairer HU. 1997. Cloning and analysis of the first cry gene of *Bacillus popilliae*. *J. Bact.* **179** (13), 4336-4341.
- Zhuang M, Oltean DI, Gomez I, Pullikuth AK, Soberón M, Bravo A and Gill SS. 2002. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J. Biol. Chem.* **277**, 13863-13872.