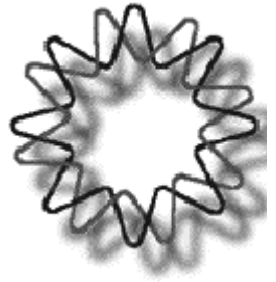




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“Caracterización de la respuesta intracelular de insectos hacia las toxinas Cry de *Bacillus thurigiensis*”.**

**Tesis que para obtener el Grado de  
DOCTOR en CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**Presenta:**

**M. en C. Ma. de los Angeles Cancino Rodezno**

**Director de tesis:**

**Dra. Alejandra Bravo de la Parra.**

**Mayo de 2010; Cuernavaca, Morelos.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**Este trabajo fue realizado en el departamento de Microbiología Molecular de Instituto de Biotecnología de la UNAM y fue dirigido por la Dra. Alejandra Bravo y financiado por CONACyT. U48631-Q; DGAPA-UNAM IN218608 Y IN206209 Y NIH AI066014.**

**Dedicatoria:**

Al amor, la paciencia, la valentía y la unión de mi familia. Dedico esta Tesis Doctoral a mi Madre, mi Tía Gloria y mi Hermano con mucho agradecimiento y felicidad por estar juntos, les tengo mucha admiración por ser quienes son. Los amo por estar, por ser y por continuar.

**Agradecimientos:**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, institución de la que he recibido a manos llenas. Me honra y me distingue ser parte de su comunidad y asumo que las palabras son insuficientes para expresar mi agradecimiento y felicidad por el privilegio de haber cursado mis estudios en la Escuela Nacional Preparatoria número 6, la Facultad de Ciencias y el Instituto de Biotecnología... todas ellas, instituciones orgullosamente UNAM.

A la Dra. Bravo: Como investigadora eres realmente inspiradora, no solo eres muy inteligente, también eres asertiva, visionaria, hiperactiva, creativa, perspicaz, arriesgada, ambiciosa y sobre todo generosa. Admiro mucho la forma en la que compartes tu conocimiento, tus ideas, tus opiniones, tus críticas, tus experiencias y hasta tu humor tan personal con la gente que te rodeamos. Gracias por dirigir esta Tesis Doctoral y por poner a mi alcance todos los recursos posibles. Gracias por la oferta de arrancar contigo tu nueva línea de investigación, ha sido muy motivante aprender y avanzar juntas, es muy gratificante trabajar contigo. Gracias por tu apoyo y tu impulso Alejandra, realmente has hecho "la diferencia" en muchos aspectos de mi vida.

Finalmente no puedo dejar de comentar "el Goya" que entonaste al recibir tu premio; quiero decirte que me sentí muy orgullosa tanto de nuestra UNAM como de ti (por la Universitaria, la Científica y la Líder de grupo que eres). "Está bien tener un sombrero por si se presenta una buena ocasión (como ésta) poder quitárselo"

A los integrantes de mi comité tutorial: Dra. Alejandra Bravo, Dr. Sergio Encarnación ,Dr. Arturo Guevara.

A los integrantes de mi jurado de examen: Dra. Alejandra Bravo, Dr. Victor Bustamante, Dr. Humberto Lanz, Dra. Laura Palomares y Dra. Rosario Vera.

A todos nuestros colaboradores: Dr. Mario Soberón, Dr. Juan Luis Jurat, Dr. Humberto Lanz, Dra. Ivonne Castro, Dr. Sergio Encarnación, Dr. Sarjeet Gill, Dr. Christopher Oppert, Dr. Yannik Pauchet, Dr. Armando Bravo, Dra. Mary Salmi.

A la gente\* que apoyó este proyecto con su trabajo, su tiempo, su talento y sus ideas:

Cynthia Alexander

Sergio Blancas

Lizbeth Cabrera

Graciela Domínguez

Biviana Flores

Norma Galicia

Isabel Gómez

Xochitl González

Magdalena Hernández  
Antonia Herrera  
Nuria Jiménez  
Gabriel Martínez Batallar  
Priscila Mercado  
Maricela Olvera  
Sabino Pacheco  
Liliana Pardo  
Claudia Pérez  
Helena Porta  
Claudia Rodríguez  
Ignigo Ruiz  
Jorge Sánchez  
Mario Soberón  
Roberto Villaseñor  
(\* algunos de ellos son además mis cuatachones ☺).

A mis compañeros y a mis amigos de laboratorio:

Emiliano Cantón  
Mónica García  
Blanca Gómez  
Gladis Jiménez  
Claudia Martínez  
Carlos Minnutti  
Beatriz Noriega  
Josué Ocelotl  
Leyvi Portugal  
Alejandro Uribe  
Esmeralda Reyes  
Luis Enrique Zavala  
Fernando Zúñiga  
Iván Arenas  
Raquel Arroyo

A la unidad de Docencia: Jalil, Gloria, Maribel y Antonio.

A la unidad de Síntesis de oligos y Secuenciación: Paul, Jorge y Eugenio.

A la Dra. Patricia León que me dio la oportunidad de aprender de ella y crecer como estudiante y que para mi fortuna, considero mi amiga.

A la gente que compartió conmigo dentro y fuera de este posgrado. *Porque tenemos memoria, tenemos amigos, tenemos los trenes, la risa, los bares:*

MG, LL, AS, AS bis, BS, MP, VE, MCH, AE, y a todos los que no voy a poner porque abandonaron el barco antes que yo (ejemplo FR y EC), los quiero a todos.

A los amigos de ayer, hoy y siempre; por que hacer un doctorado sin amigos es *peor que una palmera en el museo de cera*: Gabriela, Idalí, Pablo, Hugo, Yola, Andrés Florencia, Tamara, Giovas, Cynthia, Joaquín Sabina (somos rete cuatachones) y a aquellos cuyo nombre no incluiré, porque son tan buenos amigos que no son capaces de reprocharme el no ponerlos (o muy seguramente nunca abrirán esta tesis)

## ÍNDICE GENERAL.

### Índice de Tablas.

Tabla 1 IN. Clasificación científica de los insectos bajo estudio.	3
Tabla 2 IN. Controles biológicos aceptados por la EPA y organismos blanco.	8
Tabla 3 IN. Respuestas celulares inducidas por TFP en distintos blancos.	27
Tabla 1 M.M. Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) silvestres, transformadas o mutantes.	36
Tabla 2 M.M. Medios de cultivo bacteriano.	68
Tabla 3 M.M. Oligonucleótidos diseñados para amplificar los genes de interés.	38
Tabla 4 M.M. Anticuerpos y condiciones para detectar proteínas de interés.	39
Tabla 5 M.M. Esquema general del diseño experimental del Análisis tipo DIGE para el proteoma de intestino de <i>Ae. aegypti</i> retado con Cry11Aa	40
Tabla 6 M.M. Programación de la electroforesis de primera dimensión en el IPG phore.	80
Tabla 1 R. Toxicidad de Cry1Ab y Cry11Aa silvestres y mutantes en <i>M.sexta</i> y <i>Ae. aegypti</i>	42
Tabla 2 R. Pesos moleculares predichos para las proteínas de la ruta p38 de diferentes insectos.	46
Tabla 3 R. Estrategias de silenciamiento ensayadas para la interferencia de genes de larvas de <i>Ae. aegypti</i> .	77

### Índice de Figuras.

Figura 1 IN. Fase vegetativa y fase de esporulación de Bt.	11
Figura 2 IN. Dominios estructurales de las toxinas Cry.	11
Figura 3 IN. Toxicidad de Cry: modelo de formación de poro vs modelo de señalización.	13
Figura 4 IN. Modelo de formación de poro.	15
Figura 5 IN. Generalidades en el mecanismo de acción de las TFP.	19
Figura 6 IN. Correlación entre la eficiencia en melanización y la resistencia hacia Bt en <i>Helicoverpa armigera</i>	24
Figura 7 IN. Escenarios posibles de la respuesta celular eucariota inducida por TFP.	25
Figura 1 A. Respuesta de los nemátodos silenciados en distintas MAPK a la intoxicación con Cry.	32
Figura 1 M.M. Diagrama de flujo de las estrategias experimentales.	35
Figura 2 M.M. Diagrama de flujo de la técnica de DIGE	41
Figura 1 R. Inducción del transcrito de p38 en <i>M. sexta</i> por Cry1Ab.	43
Figura 2 R. Inducción del mensajero de p38 en <i>Ae. aegypti</i> provocada por la exposición a Cry11Aa.	44
Figura 3 R. Inducción del mensajero de p38 en <i>M. sexta</i> provocada por la exposición a Cry1Ab.	45
Figura 4 R. PCR cuantitativo del mensajero de p38 en <i>M. sexta</i> retada con la CL <sub>50</sub> Cry1Ab.	45
Figura 5 R. Inducción de la proteína p38 en <i>Ae. aegypti</i> provocada por la exposición a Cry11Aa.	46
Figura 6 R. Inducción de la proteína p38 en <i>M. sexta</i> provocada por la exposición a Cry1Ab.	47
Figura 7 R. Fosforilación de la proteína p38 en <i>Ae. aegypti</i> en respuesta a la exposición a Cry11Aa.	47
Figura 8 R. Fosforilación de la proteína p38 en <i>M. sexta</i> en respuesta a la exposición a Cry1Ab.	48
Figura 9 R. Papel de p38 en la sensibilidad de la línea celular 4A3A hacia la toxina Cry11Aa.	49

Figura 10 R. Células 4A3A de <i>A. gambiae</i> transfectadas con la PVF.	49
Figura 11 R. Inmunodetección de la proteína Sek en la línea celular 4A3A de <i>A. gambiae</i> entre un cultivo tratado con dsRNA de Sek y el control	50
Figura 12 R. Inmunodetección de p38 en individuos de <i>M. sexta</i> tratados con diferentes cantidades de dsRNA de p38.	51
Figura 13 R. Silenciamiento de p38 en <i>M. sexta</i> y <i>Ae. aegypti</i>	51
Figura 14 R. Gráfica de la mortalidad causada por Cry1Ab en larvas de <i>M. sexta</i> silenciadas en p38 y en larvas control.	52
Figura 15 R. Gráfica de la mortalidad causada por Cry11Aa en larvas de <i>Ae. aegypti</i> silenciadas en p38 y en larvas control.	53
Figura 16 R. Adecuación de la técnica de 2D para <i>A. aegypti</i> .	54
Figura 17 R. Candidatos preliminares del proteoma diferencial del intestino de <i>Ae. aegypti</i> tratados con toxina específica	55
Figura 18 R. Imagen del Picking Gel con los spots candidatos resultantes del análisis DIGE.	55
Figura 19 R. Gráficos del análisis tipo DIGE.	56
Figura 20 R. Aportación al modelo de formación de poro.	65
<b>RESUMEN y ABSTRACT.</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN .</b>	3
<b>-<i>Aedes aegypti</i>, <i>Anopheles gambiae</i> y <i>Manduca sexta</i> como modelos de estudio.</b>	3
- <i>Ae. aegypti</i> como vector del dengue.	4
- <i>A. gambiae</i> como vector de la malaria.	5
- <i>M. sexta</i> como plaga agrícola.	6
-Control de plagas.	6
-Biocontrol.	8
<b>-<i>Bacillus thuringiensis</i> y sus toxinas.</b>	10
-Generalidades.	10
-Mecanismo de acción de toxinas Cry: modelo de señalización y modelo de formación de poro .	13
<b>-Toxinas formadoras de poro (TFP).</b>	16
-Generalidades.	16
-Clasificación.	17
-Mecanismo general de acción de las TFP.	18
-Efectos de las TFP en la célula blanco.	19
<b>-Mecanismos de respuesta celular eucariota.</b>	20
-Respuesta general a estrés y participación de las MAPK.	20
-Mecanismos de defensa desarrollados por las células eucarióticas para contender con infecciones bacterianas: Sistema Inmune.	22
-Efectos intracelulares inducidos por TFP.	24
<b>-Respuestas intracelulares eucariotas inducidos por TFP: Mecanismos de muerte y defensa celular</b>	26
-Apoptosis inducida por concentraciones sublétricas de toxina.	26
-Muerte celular por piroptosis inducida por TFP.	28
-Muerte celular por oncosis inducida por TFP.	28
-Activación de biosíntesis de lípidos.	29
-Papel de protección de la autofagia.	29
-Eliminación de TFP por mecanismos endocíticos.	30
-Papel de protección de la autofagia.	30
-Activación de la ruta de MAPK/p38.	30
<b>ANTECEDENTES.</b>	31

<b>HIPÓTESIS.</b>	34
<b>OBJETIVOS.</b>	34
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	35
Purificación de cristales de Bt (Cry11Aa y Cry1Ab).	35
Crecimiento de líneas celulares de Mosquito.	36
Ensayos de toxicidad.	36
Bioensayos: <i>M. sexta</i> y <i>Ae. aegypti</i> .	36
RT-PCR y PCR cuantitativo.	37
Silenciamiento de genes por RNAi	37
Ensayos tipo Western blot.	39
Análisis de expresión diferencial de proteínas en geles bidimensionales (DIGE, por sus siglas en inglés: "Differential in Gel Electrophoresis").	39
<b>RESULTADOS.</b>	42
<b>1) Análisis de la sensibilidad de las larvas de <i>Ae. aegypti</i> a la toxina Cry11Aa y de <i>M. sexta</i> a la toxina Cry1Ab.</b>	42
<b>2) Selección de una línea celular de mosquito sensible a Cry.</b>	42
<b>3) Análisis de la expresión de genes de la ruta de p38.</b>	43
<b>4) Análisis de la expresión de p38.</b>	44
4A) Expresión del mensajero con respecto al tiempo en células del intestino de larvas de <i>Ae. aegypti</i> intoxicadas con Cry11Aa	44
4B) Expresión del mensajero con respecto al tiempo en células del intestino de larvas de <i>M. sexta</i> intoxicadas con Cry1Ab.	44
4C) Expresión protéica vs tiempo en células del intestino de larvas de <i>Ae. aegypti</i> intoxicadas con la CL <sub>50</sub> Cry11Aa.	45
4D) Expresión protéica vs tiempo en células del intestino de larvas de <i>M. sexta</i> intoxicadas con la CL <sub>50</sub> Cry1Ab.	46
<b>5) Análisis de la fosforilación de p38.</b>	47
5A) fosforilación de la proteína vs tiempo de exposición a la CL <sub>50</sub> de Cry11Aa en células del intestino de larvas de <i>Ae. aegypti</i> .	47
5B) Fosforilación de la proteína vs tiempo de exposición a la CL <sub>50</sub> de Cry1Ab en células del intestino de larvas de <i>M. sexta</i> .	47
<b>6) Análisis funcional de la ruta de p38 en la intoxicación con Cry.</b>	48
6A) En la línea celular 4A3A de <i>A. gambiae</i> .	48
6B) En larvas de <i>M. sexta</i> .	50
6C) En larvas de <i>Ae. Aegypti</i> .	52
<b>7) Análisis proteómico de larvas de <i>Ae. Aegypti</i> intoxicadas con Cry11Aa.</b>	53
<b>DISCUSIÓN.</b>	57
<b>CONCLUSIONES.</b>	66
<b>PERSPECTIVAS.</b>	66
<b>ANEXO DE MATERIAL Y MÉTODOS</b>	67
Cepas bacterianas y medios de cultivo.	67
Transformación de Bt <i>israelensis</i> con Cry1Ab.	68

Purificación de cristales de Cry11Aa y Cry1Ab.	69
Cuantificación de proteína por método de Bradford.	70
Solubilización de cristales y tripsinación.	70
Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).	70
Tinción de proteínas con azul de Commassie coloidal y Plata.	70
Crecimiento de líneas celulares de mosco.	72
Ensayos de toxicidad.	72
Bioensayos.	73
Diseño de oligonucleótidos específicos de genes de la ruta de p38.	74
Extracción de RNA total y RT-PCR.	74
<b>qRT-PCR (PCR Cuantitativo o PCR en tiempo real).</b>	<b>75</b>
Síntesis <i>in vitro</i> de dsRNA.	75
Administración de dsRNA a línea celular.	76
Administración de dsRNA a larvas.	76
Extracción de proteínas totales de la línea celular 4A3A; de intestino de larva de <i>Ae. aegypti</i> ; de intestino de larva <i>M. sexta</i> y extracción de proteínas fosforiladas.	77
Inmuno detección (Western blot).	78
Geles bidimensionales (2-D).	79
Análisis de expresión diferencial de proteínas en geles bidimensionales (DIGE, por sus siglas en inglés: "Differential in Gel Electrophoresis").	81
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>83</b>
<b>ARTÍCULOS INDEXADOS DE PRIMER AUTOR.</b>	<b>88</b>



## RESUMEN.

Los insectos plaga causan daños agrícolas, de salud, económicos y/o ecológicos; con el objetivo de controlarlos sin efectos colaterales, se ha recurrido al control biológico. El agente de control más usado es la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt), cuyo efecto insecticida es mediado por toxinas protéicas, denominadas genéricamente Cry. Existen alrededor de 200 diferentes genes conocidos que codifican para las toxinas formadoras de poro (TFP) Cry con efectos específicos en distintos órdenes de invertebrados; por ejemplo: Cry11Aa presenta especificidad hacia dípteros tales como *Aedes aegypti* y *Anopheles gambiae*; así como Cry1Ab tiene por blanco distintos lepidópteros como *Manduca sexta*. Los estudios del mecanismo de acción de las proteínas Cry han proporcionado evidencia para plantear el modelo de formación de poro. Aunque el escenario más obvio en consecuencia de la formación de poro, es el cambio en el balance iónico e hídrico que desencadena en lisis celular, estudios recientes han confirmado a las TFP como disparadores respuesta de la célula eucariota mediados por señalización, tales como la muerte programada y mecanismos de supervivencia (tales como la ruta de MAPK/p38).

En el presente trabajo iniciamos la caracterización de la respuesta intracelular en insectos hacia la exposición a toxinas de Bt, mediante el análisis de la participación de la vía de las MAPK/p38 en la respuesta a la intoxicación con toxinas Cry específicas en larvas de *M. sexta* y *Ae. aegypti*. En los dos insectos bajo estudio encontramos que la expresión de mensajero y de proteína de p38 así como la activación por fosforilación de p38 responden a la intoxicación con la Cry específica. Así mismo las mutantes Cry afectadas en oligomerización no inducen la fosforilación de p38. El silenciamiento de p38 en ambos insectos genera larvas hipersensibles a la toxina Cry específica. Así mismo, se realizaron ensayos del tipo proteómico para la identificación de proteínas involucradas en la respuesta de las células del intestino de *Ae. aegypti* ante la intoxicación específica con la toxina Cry11Aa. Los análisis proteómicos de intestino de mosquito retados con Cry11A CL<sub>10</sub> revelaron proteínas diferenciales involucradas en sistema inmune innato; dichas proteínas serán silenciadas mediante las técnicas de RNAi desarrolladas en el presente trabajo. Mediante el análisis del proteoma de intestino de mosquito retado con la CL<sub>50</sub> de Cry11A esperamos identificar nuevas entidades

protéicas que nos permitan aumentar el conocimiento sobre el mecanismo de respuesta por la que las células intestinales de insectos responde a la intoxicación con Cry.

## **ABSTRACT**

Pest insects can damage agricultural crops, cause illness as vector human disease, and affect economics and ecological issues. With the goal of control insects without side effects, biological control represents a promising alternative; the most popular biocontrol agent is the bacteria *Bacillus thuringiensis* (or Bt). Bt produces crystals of proteinaceous pore forming toxins which are encoded by at least 200 different *cry* genes against several orders of invertebrates; for example: the specific toxin to diptera -as *Aedes aegypti*- is Cry11Aa and Cry1Ab to lepidoptera, as *Manduca sexta*. The mode of action of Cry toxins has been explained by the pore forming model, that points to cell lysis by ion balance is the most obvious scenario in consequence to toxin attack to the cell membrane. Beyond this model, there are novel work that proposes pore forming toxins as triggers of cellular signaling to respond toxin injury; responses such programed cell death or surviving (e.g. trough p38 MAPK route).

In the present work we started the elucidation of insect intracelullar response against Cry toxins. We studied the MAPK/p38 role in the insect defense at Cry challenge. We found that mRNA and protein levels in *M. sexta* and *Ae. aegypti* are modulated by the specific Cry; and that Cry induces phosphorilation of p38 in both insects. Cry1Ab and Cry11Aa mutants with loss in oligomerization didnt trigger the p38 phosporilation. Silencing of p38 become in hypersensitive insect larvae to Cry.

In the other hand, Proteomic technology allowed the identification of differential expression proteins under the Cry11Aa condition. The mosquito midgut cells challenged with Cry11A LC<sub>10</sub> yielded diferential proteins involved in innate immune system. RNAi techniques developed in our laboratory will be useful for silencing the protein results of this analysis, and in the future, the differential proteins resolved of the CL<sub>50</sub> de Cry11A stimuly. These identification allow us to suggest new proteins implicated in the response mechanism of insect cell to Cry and to increase the knowledge about it .

## INTRODUCCIÓN.

### ***Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* y *Manduca sexta* como modelos de estudio.**

Los insectos -debido a su enorme diversidad y capacidad de adaptación- son considerados los organismos más exitosos de todos los tiempos (a la fecha se han estimado un mínimo de 2 millones de especies) (Ruppert, 2004) ; su versatilidad les ha permitido colonizar todos los ecosistemas -desde acuáticos hasta terrestres- donde llevan a cabo importantes papeles en la cadena trófica (Ross y Jarzembowski, 1993; Hokkanen, 2001). Sin embargo, algunas especies han sido más investigadas que otras debido a su impacto para el ser humano; evidentemente los insectos que han resultado ser perjudiciales para los humanos han sido objeto de mayor estudio, particularmente los que están vinculados con problemas de salud, como los mosquitos vectores de enfermedades humanas como el dengue (*Ae. aegypti*) y la malaria (*A. gambiae*) (Tabla 1 IN.); así como los insectos que dañan producciones agrícolas (insectos depredadores de cultivos de importancia económica y/o alimenticia) como *M. sexta* (Tabla 1 IN.). Estas especies han acaparado la atención de los entomólogos por considerárseles una plaga (Ross y Jarzembowski, 1993).

Tabla 1 IN. Clasificación científica de los insectos bajo estudio.

Dominio:	<a href="#">Eukaryota</a>		
Reino:	<a href="#">Animalia</a>		
Subreino:	<a href="#">Metazoa</a>		
Fila:	<a href="#">Arthropoda</a>		
Clase:	<a href="#">Insecta</a>		
Orden:	Diptera		Lepidoptera
Familia:	<i>Culicidae</i>		<i>Sphingidae</i>
Género:	<i>Aedes</i>	<i>Anopheles</i>	<i>Manduca</i>
Especie:	<b><i>Ae. aegypti</i></b>	<b><i>A. gambiae</i></b>	<b><i>M. sexta</i></b>

El dengue y la malaria destacan por ser enfermedades humanas que representan problemas importantes de salud pública; estas enfermedades parasitarias son producidas por arbovirus y por protozoarios del género *Plasmodium*, respectivamente. Ambos patógenos requieren de mosquitos vectores para acceder a su hospedero. Los principales dípteros transmisores del dengue y la fiebre amarilla pertenecen al género

*Aedes*, y los mosquitos del género *Anopheles* transmiten la malaria. Las hembras adultas son las que transmiten la enfermedad ya que al ser hematófagas, durante la succión de la sangre inoculan simultáneamente los virus o los protozoarios hacia el organismo hospedero. Desde que *Ae. aegypti* y *A. gambiae* se identificaron como especies transmisoras de enfermedades humanas, muchas de las medidas de control de estas enfermedades se han centrado en los mosquitos. El dengue no ha podido ser erradicado de México debido, en parte, a la existencia de poblaciones de dípteros resistentes a insecticidas químicos (Barillas-Mury, 2000). La malaria está muy controlada y se tienen menos de 2000 casos al año por lo que se considera que está en vías de erradicación, la transmisión de esta enfermedad se da en focos hiperendémicos en las costas de Chiapas y Sinaloa. El genoma de ambos mosquitos se ha secuenciado: *Ae. aegypti* cepa Liverpool posee 1.3 Gb y 16 000 genes predichos y *A. gambiae* PEST tiene 260 Mb y 14 000 genes predichos (Holt *et al.*, 2002; Nene *et al.*, 2007). Esta información ha sido empleada para poder encontrar nuevas estrategias moleculares que ayuden a prevenir la diseminación de la malaria y el dengue.

Por otra parte, los lepidópteros -que agrupan a las mariposas y las polillas- generalmente constituyen plagas en sus estadios juveniles (orugas); *Manduca sexta* ha sido considerada un excelente organismo modelo para entender la fisiología y el desarrollo de los lepidópteros en general. Diversos estudios han abordado la biología (ejemplo: metamorfosis) y las implicaciones en actividades humanas (ejemplo: control poblacional de insecto) de *M. sexta*. Además, como modelo de estudio este insecto es factible de manipularse y criarse en los distintos estadios de su ciclo de vida. Por estas razones *M. sexta* representa un modelo ideal para el estudio de la fisiología de insectos.

### **Aedes aegypti como vector del dengue.**

El género *Aedes* es el vector del virus del dengue, el cual infecta a humanos y a algunos animales como los primates. Aunque existen varias especies del género *Aedes* distribuidas principalmente en los trópicos (*Ae. albopictus*, *Ae. scutellaris*, *Ae. africanus*, *Ae. luteocephalus*) el principal vector urbano de dengue a nivel mundial es *Ae. aegypti* (Gubler, 2001). Los virus del dengue son también conocidos como arbovirus, el cual es un término ecológico que implica que la transmisión entre los hospederos vertebrados y

el virus es dependiente de artrópodos hematófagos que sirvan de vectores. La estrategia del virus del dengue es ser adquirido a través de la sangre infectada de una persona enferma, una vez dentro del díptero, el virus infecta las células del mosquito propagándose hasta las glándulas salivales del mosquito, haciéndose accesible a la siguiente persona a la que el mosquito infecte por picadura. Una vez dentro del hospedero humano el virus se replica es en los monocitos, sin embargo, el virus ha sido aislado de tejidos como el hígado, pulmones, riñones, nodos linfáticos, estómago, intestino y cerebro humanos (Gubler, 2001).

*Ae. aegypti* cuenta con determinadas características que han favorecido la propagación de esta enfermedad convirtiéndola en epidemia: el hábitat antropófilo del mosquito permite el establecimiento de criaderos en la cercanía de las viviendas humanas en cualquier depósito de agua. Los huevos de esta especie son capaces de eclosionar en contenedores domésticos y pueden llevar a cabo todo su ciclo de vida al interior de las casas; en adición un solo mosquito a lo largo de su vida puede infectar a varias personas, las cuales son el hospedero final, donde la infección se desarrolla. Además de la transmisión del virus a humanos, la hembra de *Ae. aegypti*, por un mecanismo no entendido aún, puede transmitir el virus verticalmente a su descendencia (Chen, *et al.*, 1990). Por lo anterior, cerca de la mitad de la población humana mundial está en riesgo de ser infectada y se estima que hay entre 50 y 100 millones de enfermos cada año.

### **Anopheles gambiae como vector de la malaria.**

La malaria humana es la principal causa de decesos humanos a nivel mundial. Cada año aproximadamente 2 millones de individuos mueren por malaria (Sherman, 2001). Esta enfermedad resulta de la infección por alguna de las 4 especies del género *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*. Los síntomas se presentan usualmente 10 días después de que la persona ha sido inoculada por el mosquito y son tipificados por fiebre, náuseas y respiración intensa, así como infecciones oportunistas que complican la recuperación del individuo.

Además del desarrollo de fármacos para erradicar a los protozoarios responsables de la infección por malaria, el otro blanco para controlar la dispersión de la enfermedad es el insecto que transmite esta enfermedad. Después de que el mosquito ha internalizado al

parásito a través de la ingestión de la sangre del humano infectado, el parásito se replica en el intestino del mosquito y de allí migra a las glándulas salivales donde queda disponible para ser diseminado durante la picadura a un segundo hospedero humano. Una vez dentro del torrente sanguíneo humano, el parásito migra al hígado, donde se reproduce, la progenie invade las células sanguíneas donde los ciclos de reproducción y reinfección ocurren a expensas de la integridad celular de los hematocitos, los síntomas son fiebre y anemia severas (Sherman, 2001).

### **Manduca sexta como plaga agrícola.**

En sus estadios larvarios *M. sexta* es una oruga especialista en consumir hojas de plantas Solanaceas como por ejemplo: la papa (*Solanum tuberosum*), el jitomate (*Lycopersicon esculentum*), el chile, (*Capsicum annum*) y el tabaco (*Nicotiana tabacum*). Estas plantas han sido consumidas y cultivadas alrededor del mundo por su importancia nutricional y económica. Las larvas de lepidóptero resultan voraces y devastadoras para estos cultivos debido a que pueden alimentarse de casi todos los tejidos vegetales (hojas, flores, frutos, tallos y raíces). Además este grupo representa el segundo orden de insectos con la mayor cantidad de especies, por lo cual, su control representa un verdadero reto para la humanidad en función de la preservación y mantenimiento de cultivos de importancia económica. *M. sexta* consume preferentemente hojas de tabaco, depredando sembradíos enteros; por lo que este insecto también se conoce como el gusano del tabaco (Villanueva, 1998).

### **Control de plagas.**

Los insectos plaga causan daños importantes a la agricultura, a la salud, a la economía y a la ecología (Metcalf y Metcalf, 1993). Es por esto que con el objetivo de erradicarlos, a mediados del siglo XX se incrementó considerablemente el uso de pesticidas químicos, los cuales, contaban con la característica de ser potentes, pero inespecíficos. Productos como el dicloro difenil tricloroetano (DDT) e insecticidas relacionados, se volvieron muy populares por su alta efectividad, sin embargo, las aplicaciones reiterativas y abundantes de estos plaguicidas, además de tener efectos colaterales no deseados, disminuyó su efectividad en el campo, ya que los insectos empezaron crear mecanismos de tolerancia

hacia estos productos. Por lo tanto, las cantidades aplicadas debieron incrementarse para obtener los resultados deseados, lo que fomentó su uso indiscriminado y un mayor número de insectos resistentes. En un intento por seguir usando controles de tipo químico, se introdujeron al mercado nuevos productos, los organofosforados y los carbamatos, los cuales proporcionaron control sobre un mayor número de plagas, sin embargo, también eliminaron inespecíficamente a los enemigos naturales de los insectos plaga (Hoffmann *et al.*, 2006).

La agricultura y los sistemas de control de insectos vectores de enfermedades humanas no sólo se valieron del uso de dosis cada vez mayores, sino de mezclas cada vez más complejas de distintos insecticidas químicos; lo cual repercutió nocivamente en la resurgencia de algunas plagas seleccionadas por resistencia a los insecticidas químicos. Además, los insecticidas químicos conllevaron otros importantes problemas como efectos negativos en organismos no blanco, impactos ecológicos por la persistencia en el ambiente de muchos químicos que se acumularon en el tejido de animales, elevación de costos para obtener los resultados de los plaguicidas iniciales y el daño general hacia la salud pública. Lo anterior trajo la necesidad de buscar estrategias sustentables para un mejor manejo de las poblaciones de insectos.

En la década de los 60's se inició la búsqueda de alternativas de control, paradójicamente algunas de las más útiles y aplicables resultaron ser las herramientas de control que han existido durante siglos y previamente a la aparición de los controles químicos y de los monocultivos (Hokkanen *et al.*, 2001). El nombre genérico que recibieron las estrategias de control de plagas que pretendían disminuir el uso de pesticidas químicos fue el de "Manejo Integral de Plagas (MIP)", el cual tiene por objetivo usar tácticas de manejo de plagas que generen un impacto ambiental mínimo, los menores riesgos a la salud y a la economía (Hoffmann *et al.*, 2006). La finalidad del MIP no es eliminar a los insectos plaga, sino disminuir su abundancia y el daño relacionado a niveles aceptables. El MIP requiere del entendimiento de la biología y la etiología de los organismos plaga así como de su ecosistema; y promueve que el número de organismos a controlar sea limitado por condiciones bióticas y abióticas que den por resultado tamaños poblacionales que se mantengan estables y adecuados a través del tiempo. Las tácticas del MIP incluyen controles de tipo manejo de cultivo (selección, rotación de

cultivos), físico (ambientes modificados y controlados), mecánico (barreras o trampas para las plagas), genético (liberación de insectos machos esterilizados) y biológico (el uso de enemigos naturales de las plagas como predadores, parasitoides, patógenos y antagonistas), este último, también llamado biocontrol, el cual difiere de otros métodos de manejo de pestes por emplear las interacciones ecológicas entre organismos vivos (Hokkanen *et al.*, 2001) (Tabla 2 IN.).

### **Biocontrol.**

Tabla 2 IN. Controles biológicos aceptados por la EPA y sus organismos blanco.

Tipo de agente de control	Nombre	Uso	Número de Productos registrados por la EPA
Bacteria	<i>Bacillus licheniformis</i>	Anti- fúngico	1
Bacteria	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	Anti- fúngico	1
Bacteria	<i>Streptomyces griseoviridis</i>	Anti- fúngico	3
Bacteria	<i>Aérobacterium radiobacter</i>	Anti- bacteriano	2
Bacteria	<i>B. popillae</i>	Insecticida (escarabajo)	1
Bacteria	<i>B. sphaericu s</i>	Insecticida (mosquitos)	2
Bacteria	<i>B. thuringiensis var. aizawai</i>	Insecticida (orugas)	8
Bacteria	<i>B. thuringiensis var. israelensis</i>	Insecticida (mosca, mosquitos)	30
Bacteria	<i>B. thuringiensis var. kurstaki</i>	Insecticida (orugas)	81
Bacteria	<i>B. thuringiensis var. tenebrionis</i>	Insecticida (escarabajo)	3
Hongo	<i>Trichoderma sp</i>	Anti-fúngico	6
Hongo	<i>Laegenidium gigantium</i>	Insecticida (mosquitos)	2
Hongo	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Insecticida (cucarachas) grillos)	5
Virus	<i>Baculoviruses</i>	Insecticida (orugas)	11

Harper D R 2006



El método de biocontrol involucra poner en contacto a la plaga problema con un enemigo natural que pueda contender con ella. Algunos hongos, virus, y bacterias patógenos, poseen mecanismos naturales para atacar a los insectos plaga en distintos estadios (huevos, larvas, pupas y adultos), por lo que se les ha importado hacia el hábitat de distintos insectos perjudiciales como estrategia de control (Harper y Kutler, 2008). La aplicación de los patógenos puede ser natural o mediante técnicas que permiten su administración por medios líquidos, polvos, aerosoles, granulados, y a través de la introducción en campo de plantas transgénicas, siendo este último el método de control biológico más polémico.

El nivel de impacto ambiental aceptable (environmental impact quotient EIQ) que pretende el MIP considera factores como la toxicidad, la vida media, la reminiscencia de producto en el suelo o en la superficie de la biomasa, el potencial que tiene el químico para ser retirado del ambiente o degradado, los efectos ecológicos, y el riesgo de la salud de los humanos expuestos (Hoffman *et al.*, 2005). Las anteriores consideraciones han permitido que “The US Environmental Protection Agency” (EPA, 2004) haya manifestado que “...Los biopesticidas son inherentemente menos tóxicos que los pesticidas químicos, tanto por su alta especificidad como porque los agentes biológicos pueden perdurar por largos periodos ejerciendo control y raramente eliminan completamente a la población plaga...”. A pesar de sus ventajas los agentes biológicos son usados en un bajo porcentaje ( 1.5% en 1995 (Hunter-Fujita *et al.*, 1998) y 1.72% en 2003 (Guillon, 2004)) del total de pesticidas empleados en el mundo. Del total de bioagentes de control usados, los de control microbiológico son un estimado del 41%, en el que predominan el uso de las bacterias, entre ellas la mas utilizada ha sido *Bacillus thuringiensis* (Bt), cuya eficiencia es alta y su producción masiva es económica. El efecto insecticida de Bt es mediado por toxinas proteicas, denominadas genéricamente Cry, las cuales son codificadas por alrededor de 200 genes (Crickmore *et al.*, 1998, 2005). Cuando las proteínas Cry son ingeridas por las larvas, éstas tardan entre 1 y 2 días en morir debido al efecto letal de las toxinas Cry que ejercen daño a las células del intestino, dejando impedido al insecto para comer/digerir su alimento.

En el campo, la efectividad de las toxinas Cry aumenta con el uso de fórmulas optimizadas de Bt para uso comercial, éstas consisten en mezclas de toxinas que hacen

más efectivas las preparaciones. Actualmente, el uso de estas cepas insecticidas, representa solo una fracción de cientos de cepas de Bt cuya aplicación aun no ha sido comercializada (Bt toxin nomenclature website at [http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/)).

### **Bacillus thuringiensis y sus toxinas.**

#### Generalidades.

Bt es una bacteria Gram-positiva miembro de la familia Bacillaceae, la cual consta de 6 miembros: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, *B. thuringiensis* y *B. weihenstephanensis* (Rasko *et al.*, 2005). Bt se distingue de otros bacilos por sintetizar las  $\delta$ -endotoxinas (Cry y Cyt), las cuales son toxinas formadoras de poro (TFP) con propiedades entomopatógenas. Existen distintas subespecies de Bt (*Bt aizawai*, *Bt darmstadiensis*, *Bt entomocidus*, *Bt alleriae*, *Bt konkukian*, *Bt tenebrionis*, *Bt israelensis* y *Bt kurstaki*) las cuales varían en la especificidad de las toxinas que producen, Por ejemplo; *Bt israelensis* produce toxinas con especificidad hacia mosquitos Cry4A, Cry4B, Cry11A y Cyt1A; así como Bt variedad *kurstaki* produce toxinas Cry1A con actividad contra lepidópteros (Tabla 2 IN.).

Bt presenta una fase vegetativa y una de esporulación para completar su ciclo de vida (Figura 1 IN.). Durante la fase de esporulación Bt produce a Cry y a Cyt como cristales paraesporales, las cuales tienen actividad tóxica y específica contra distintos órdenes de insectos y otros invertebrados (Feitelson, 1992).

La definición de las toxinas Cry es: "Cualquier proteína paraesporal producida por Bt que tenga similitud en secuencia con alguna toxina Cry ya descrita (Crickmore *et al.*, 1998)". Las toxinas Cry hasta hoy descritas, tienen un amplio rango de especificidad contra: lepidópteros, dípteros, coleópteros, himenópteros, homópteros, mallófagos y ácaros, así como contra los órdenes: Nematelminthes, Platyhelminthes y Sarcomastigophora (Aronson, 1986 Feitelson *et al.*, 1992; 1993).

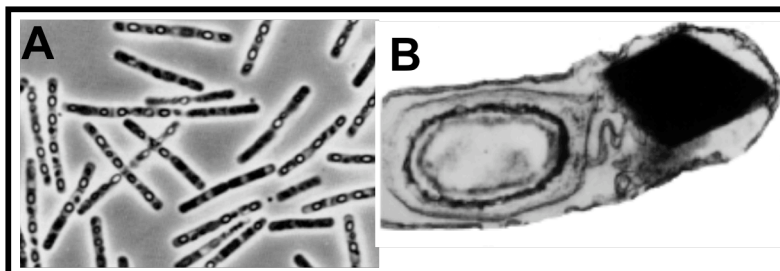


Figura 1 IN. Fase vegetativa y fase de esporulación de Bt. A) en la fase vegetativa los bacilos se encuentran concatenados, el programa de diferenciación se dispara cuando la bacteria se encuentra en limitación de nutrientes B) La espora es una forma de vida latente que puede permanecer en el ambiente por periodos de tiempo muy largos en ausencia de humedad y nutrientes. Cuando la espora se encuentra de nuevo en un medio rico que contenga los nutrientes necesarios puede germinar para comenzar de nuevo el crecimiento vegetativo, por microscopía de contraste de fases se observan las esporas y los cristales tóxicos (bipiramidales) .

Las toxinas de Bt se clasifican en base a su función y su estructura primaria, a la fecha se han dividido en más de 50 grupos, de entre los cuales el grupo de las toxinas Cry que poseen 3 dominios estructurales destaca por ser el más numeroso. Este grupo engloba miembros muy similares en estructura y función; los grupos MTX-like y Bin-like de toxinas Cry no presentan similitud de secuencia con las toxinas Cry de 3 dominios (Figura 2 IN).

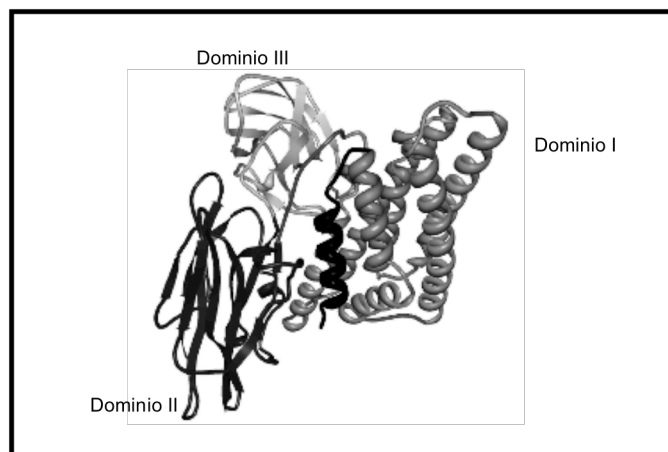


Figura 2 IN. Dominios estructurales de las toxinas Cry. El dominio I ha sido relacionado con la formación de poro , el dominio II en la unión a receptores y el dominio III está vinculado con la estabilidad de la estructura y la especificidad.

Las toxinas, semejantes a las toxinas MTX de *B. sphaericus* tienen por blanco a los mosquitos y algunas son específicas para coleópteros (Cry15, Cry23 y Cry37). El grupo que comprende a las toxinas parecidas a Bin de *B. sphaericus*, tienen por objetivo insectos coleópteros y comprenden a las toxinas Cry34 y Cry35.

Las toxinas del grupo Cry de 3 dominios presentan bloques conservados que corresponden a las regiones internas de la estructura tridimensional: El dominio I está formado por 7 hélices alfa antiparalelas y antipáticas, donde la hélice alfa-5 está rodeada del resto de las cinco hélices, cada una de estas hélices externas es de naturaleza anfipática; las hélices de este dominio miden en su mayoría más de 30 Å, lo que las convierte en candidatos capaces de atravesar la membrana hidrofóbica. Además, este dominio es parecido estructuralmente con dominios formadores de poro de otras toxinas, tales como la colicina y difteria. Así mismo, experimentos en los que se han mutado las hélices alfa 4 y alfa 5, sugieren que las hélices del dominio I participan directamente en la formación de poro. El dominio II se compone por 3 láminas beta antiparalelas que forman un  $\beta$  prisma, este dominio es el más variable en longitud, y el menos conservado en secuencia y estructura; se propone que este dominio confiere la especificidad debido a que está relacionado con la unión a receptores presentes en las microvellosidades de las células del epitelio intestinal (Figura 2 IN; Piggot, 2007). El dominio III está formado por dos láminas beta antiparalelas que forman un beta sandwich; debido a que el dominio III de la toxina Cry1Ac interacciona con Gal-Nac (de naturaleza oligosacárida) se ha propuesto que este dominio tiene sitios de unión a receptores a través de un grupo glicosil-fosfatidil inositol (GPI, segundo receptor). Los estudios realizados de cada uno de los dominios que conforman a las proteínas Cry, su funcionamiento y el mecanismo de acción en general, han proporcionado suficiente evidencia experimental para plantear dos distintos modelos que intentan explicar como es que actúan estas toxinas en sus células blanco: el modelo de formación de poro y el modelo de señalización celular (Bravo *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006).

### Mecanismo de acción de toxinas Cry: modelo de señalización y modelo de formación de poro.

Tanto el modelo de señalización como el modelo de formación de poro comparten los pasos iniciales (Figura 3 IN.) siguientes: Las toxinas Cry son ingeridas en su forma inactiva (de protoxinas) por la larva de insecto, una vez ubicadas en el lumen del intestino del insecto estas proteínas son solubilizadas por el pH alcalino. La presencia de proteasas induce los cortes proteolíticos, que conllevan a la formación del fragmento

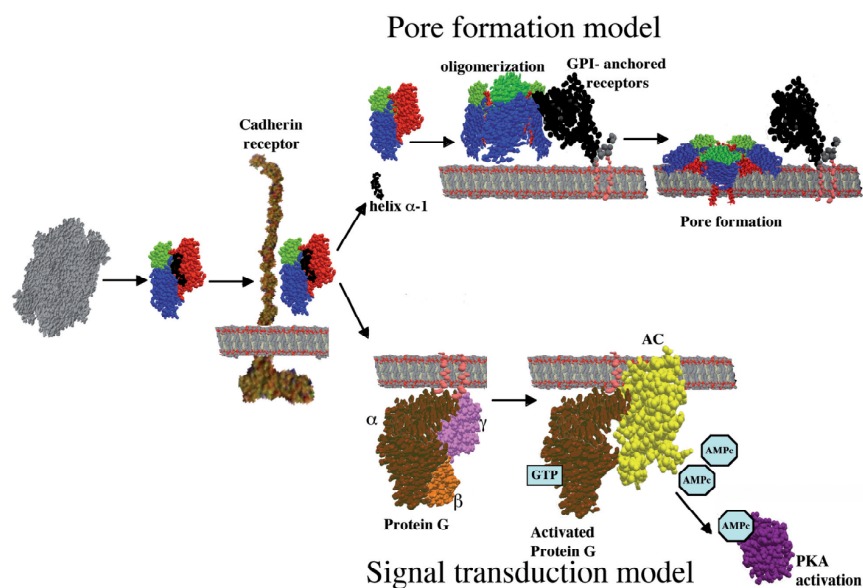


Figura 3 IN. Toxicidad de Cry: Modelo de Formación de Poro vs Modelo de Señalización. El modelo de Formación de poro propone que la toxicidad de Cry depende de su unión al menos a 2 distintos receptores (caderina y aminopeptidasa). Estipula que la entidad oligomérica de la toxina es indispensable para formar el poro que lisará la célula. El modelo de señalización indica que la interacción de solo el receptor caderina con la entidad monomérica de Cry es suficiente para que la muerte celular ocurra, proponiendo que el poro no es necesario para matar a la célula, ya que la interacción monómero-receptor desencadena una transducción de señales a través de la cual sobreviene la muerte.

activo de aproximadamente 60 kDa, el cual presentan gran afinidad por el receptor caderina (Vadlamudi *et al.*, 1995). A continuación, el modelo de señalización (derivado de estudios realizados en cultivos de células High Five de *Trichoplusia ni* propone que la toxicidad de Cry1Ab está dada por proceso de señalización intracelular (independiente a la formación de poro) en el cual una proteína G se activa en respuesta a la unión monómero- receptor caderina. La proteína G activa a la adenilato ciclasa quien promueve la producción de cAMP intracelular. Los niveles elevados de cAMP disparan la ruta de la proteína cinasa A (PKA), lo que conlleva finalmente a la muerte por inflamación del tejido producida por una ruptura de las membranas plasmática y de los organelos debido al incremento de la permeabilidad celular (oncosis). El modelo de señalización cuestiona al modelo de Formación de Poro como mecanismo de acción para la muerte celular por intoxicación con Cry, aseverando que la muerte celular ocurre sólo por la interacción de la toxina con el receptor caderina. Sin embargo, no hay otro reporte en la literatura que respalde este modelo. También es importante señalar que este modelo se basa en el efecto de la toxina Cry1Ab en una línea celular que expresan un receptor no endógeno. Además, la línea High Five fue generada a partir de ovario de *Trichoplusia ni* y no de células de intestino de lepidóptero que son el blanco específico de Cry1Ab. En contraste, el modelo de formación de poro es respaldado por estudios realizados *in vitro* y bioensayos; dicho modelo propone que la unión del monómero de Cry a la caderina facilitan el corte de la hélice alfa-1 (Gómez *et al.*, 2002), lo que subsecuentemente permite la interacción de varios monómeros para formar un oligómero, el cual se caracteriza por aumentar significativamente su afinidad por segundos receptores, tales como proteínas ancladas por glicosil fosfato inositol (GPI), a aminopeptidasas N (*M. sexta*; Bravo *et al.*, 2007) y alcalino fosfatasas (*Heliiothis virescens* y *Ae. Aegypti*) (Bravo, 2004; Jurat-Fuentes y Adang, 2006). Una vez ubicado en la superficie celular, el oligómero se inserta en la membrana formando un poro. Finalmente, como consecuencia del flujo de agua y iones a través del poro sobreviene la lisis de las células y la muerte del insecto (Knowles *et al.*, 1993; Rajamohan, 1998; Boonserm, 2005).

Varios trabajos realizados en nuestro laboratorio han permitido proponer que la oligomerización de Cry es un evento complejo indispensable para la toxicidad y que el oligómero es la conformación de pre-poro resultante de varias toxinas monoméricas que

han sufrido proteólisis en la hélice  $\alpha$ -1 debido a la interacción con un primer receptor (Figura 4 IN.).

Estudios estructurales de la toxina Cry1Ab han mostrado que la hélice  $\alpha$ -3 del dominio I posee “coiled-coils” (motivos estructurales que permiten la sobreposición de monómeros protéicos), por lo tanto, se ha sugerido que estas estructuras favorecen el superenrollamiento entre las proteínas Cry monoméricas mediando la oligomerización. Recientemente en nuestro laboratorio se generaron mutantes puntuales en la hélice  $\alpha$ -3 de Cry1Ab las cuales siguen siendo capaces de unir a la caderina con una afinidad similar a la de la toxina silvestre, pero están afectadas en la capacidad de formar un

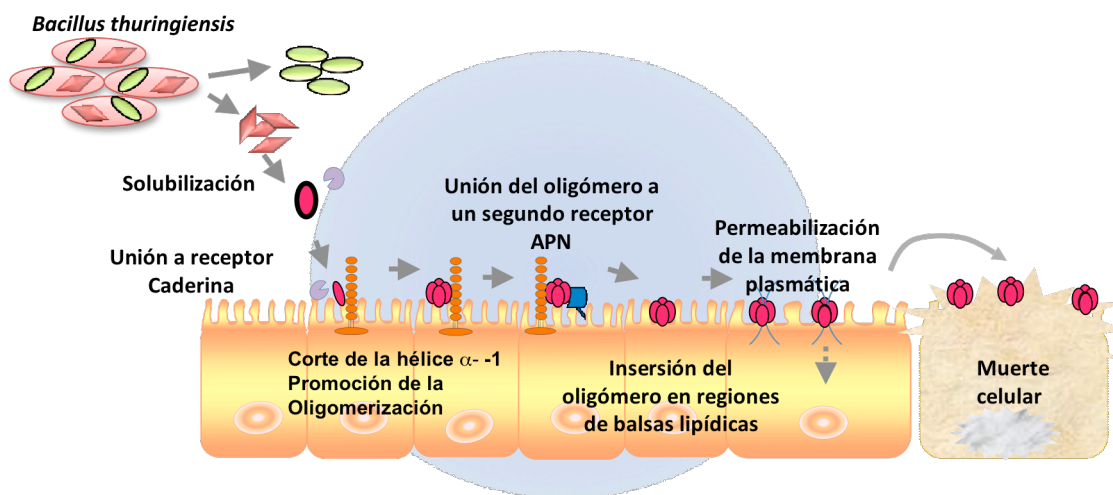


Figura 4 IN. Modelo de Formación de Poro. El modelo de Formación de Poro se conforma por pasos secuenciales que han sido confirmados por distinta y robusta evidencia experimental

oligómero, y por lo tanto en la formación de poro y la toxicidad (Jimenez-Juarez). En un estudio similar y utilizando mutaciones puntuales en la toxina Cry11Aa, se encontró un fenotipo deficiente en formación de poro que correlacionó directamente con ausencia de toxicidad, sin embargo, no se afectó la unión de monómero a receptores, estos resultados en su conjunto apoyan el modelo de formación de poro, el cual señala que se requiere de la interacción de un oligómero con un segundo receptor para la formación de un poro responsable de lisar la célula (Bravo *et al.*, 2004, Bravo *et al.*, 2007). Al mismo tiempo, la generación de toxinas Cry1A modificadas, denominadas Cry1AMod, a las cuales se les eliminó la hélice  $\alpha$ -1 mediante ingeniería genética, no requieren de cortes

proteolíticos (ni de la interacción con caderina) para formar oligómero. El resultado fue una toxina capaz de matar larvas de lepidópteros, tanto sensibles como resistentes (debido al silenciamiento, mutaciones o infuncionalidad de la caderina)

Estos resultados señalan hacia la caderina como un elemento indispensable que promueve el corte de la  $\alpha$ -hélice facilitando la oligomerización y la toxicidad de las proteínas Cry. El modelo de formación de poro (Figura 4 IN.) no descarta otros eventos de señalización intracelular que puedan desencadenarse por la formación de poro en células de insecto (Griffits y Aroian, 2005) así como ha sido demostrado previamente en otros modelos eucariotas retados con TFP (Aroian y van der Goot, 2007).

### **Toxinas Formadoras de Poro (TFP).**

#### **Generalidades.**

El blanco de una toxina puede ser un componente intracelular, o la membrana lipídica, como es el caso de las Toxinas de Daño a Membrana (TDM). Las TDM pueden ser divididas en: enzimas lipolíticas (fosfolipasas), toxinas parecidas a detergentes (saponina, surfactina) y toxinas formadoras de poro (TFP), que forman canales estructurados en la membrana lipídica. Este daño a la membrana incrementa la permeabilidad no específica y cuando este daño supera la capacidad homeostática de la célula, el efecto es letal (Menestrina y Serra, 2001).

Las proteínas Cry son TFP y aunque las TFP son un grupo heterogéneo en cuanto a origen y estructura, típicamente son secretadas como monómeros que –después de ser procesados – se insertan en forma de oligómeros en la membrana celular del hospedero formando un poro (Burns, 2003), que generalmente conlleva a la muerte celular por desintegración membranal (Braun *et al.*, 2002). Hay que hacer notar que dependiendo de la concentración de la TFP, de la célula blanco, y el tiempo de exposición, el daño generado por la perforación de la membrana plasmática puede variar. Los dos extremos del destino celular del hospedero ante las TFP, son la lisis osmótica o la sobrevivencia celular (por reparación membranal), los escenarios fisiológicos más estudiados son los que están vinculados a la muerte celular, mientras que las respuestas que conllevan a la sobrevivencia celular no están caracterizadas totalmente.



Las TFP son factores de virulencia producidos por organismos de distintos fila, éstas se encuentran en venenos, fluidos y secreciones de muchos organismos (Menestrina y Serra, 2001) y tienen diferentes blancos, principalmente células eucariotas. Este grupo de toxinas no presenta conservada su secuencia de aminoácidos, ni su estructura, sin embargo, las toxinas han sido clasificadas siguiendo los siguientes criterios.

### Clasificación.

Las TFP se dividen en dos categorías: las formadoras de poro pequeño y deben sus siglas a su nombre en inglés “Small Pore Formers” (SPF) y las formadoras de poro grande –“Large Pore Formers” (LPF), con base en el tamaño del radio del poro, el cual puede variar entre 0.5 y 3nm en ambas categorías. Las SPF incluyen péptidos de 40–50 aminoácidos, éstas son secretadas por microorganismos (la  $\alpha$ -toxina de *Staphylococcus aureus*) o producidas por animales (veneno de abeja) o por plantas (defensinas) (Menestrina y Serra 2001). Sin importar las diferencias en estructura secundaria, estas toxinas tienen en común una organización anfipática frecuentemente estabilizada por puentes disulfuro.

Las LPF son proteínas que varían entre 20 y hasta 200 KDa, las cuales son producidas por plantas, animales y microorganismos. No poseen puentes disulfuro ni motivos estructurales comunes, pero presentan un mecanismo de acción similar.

Las TFP en función de su estructura secundaria se clasifican en  $\alpha$ -TFP (si forman poros mediante  $\alpha$ -hélices) o  $\beta$ -TFP (si forman poros con barriles- $\beta$  transmembranales; Lacy y Stevens, 1998). Las estructuras de algunas  $\alpha$ -TFP han sido caracterizadas únicamente en su forma monomérica (colicinas y toxinas Cry). Todas han mostrado poseer hélices hidrofóbicas o anfipáticas lo suficientemente largas para atravesar la bicapa lipídica. El dominio de formación de poro es un paquete helicoidal con hélices interiores de naturaleza hidrofóbica y hélices anfipáticas externas. Se propone que la penetración a la membrana inicia con la inserción de las hélices hidrofóbicas del paquete helicoidal, mientras que la agregación de hélices insertadas originan el canal del poro transmembranal (Menestrina y Serra, 2001).

En el caso de las  $\beta$ -TFP, la inserción en la membrana involucra solamente una pequeña parte de la proteína, es decir, una vez que las toxinas se han rearmado

oligoméricamente, la única estructura que se inserta a membrana es el barril  $\beta$  conformado por el aporte de una par de láminas  $\beta$  por cada monómero involucrado en la oligomerización (Menestrina y Serra, 2001).

Las TFP interactúan con la membrana plasmática valiéndose de la exposición de residuos aromáticos que unen la bicapa; como es el caso de las citolisinas dependientes de colesterol (CDC) producidas por distintos géneros de bacterias Gram-positivas, tales como *Clostridium*, *Bacillus*, *Streptococcus* y *Listeria* (Palmer, 2001), o la presencia de hélices hidrofóbicas, como la toxina de la difteria o las colicinas producidas por *C. diphtheria* y algunas cepas de *Escherichia coli*, respectivamente (Parker y Feil, 2005). Además, las TFP usualmente se conforman por múltiples dominios que les confieren las funciones indispensables para llevar a cabo su mecanismo de acción (Parker y Feil, 2005).

#### Mecanismo general de acción de las TFP.

Las TFP son producidas como proteínas monoméricas solubles, capaces de sufrir transición de su naturaleza hidrofílica a anfipática, lo que les permite entrar en contacto con las membranas lipídicas. Las TFP tienen muchos sitios de unión de alta afinidad a receptores, pero también se valen de unión a lípidos de baja afinidad (Lesieur *et al.*, 1997). Las TFP interactúan con regiones particulares de la membrana denominadas balsas lipídicas. Estos sitios permiten a las TFP alcanzar una alta concentración local de poros, así como interactuar con elementos de transducción de señales ubicados en la otra cara de las balsas lipídicas.

El mecanismo general de acción de las PFT es el siguiente: la unión a receptor induce un corte proteolítico que expone regiones hidrófobas del monómero y por lo tanto, promueve un cambio conformacional, éste es, la estructura de pre-poro que involucra la oligomerización, así como el favorecimiento de interacciones no covalentes que hacen posible la agrupación de este complejo protéico (Figura 5 IN.), permitiendo una inserción a la membrana de manera estable. Esto resulta en un poro transmembranal que permite el cruce de agua y moléculas pequeñas, pero excluye proteínas, ácidos nucleicos y organelos.

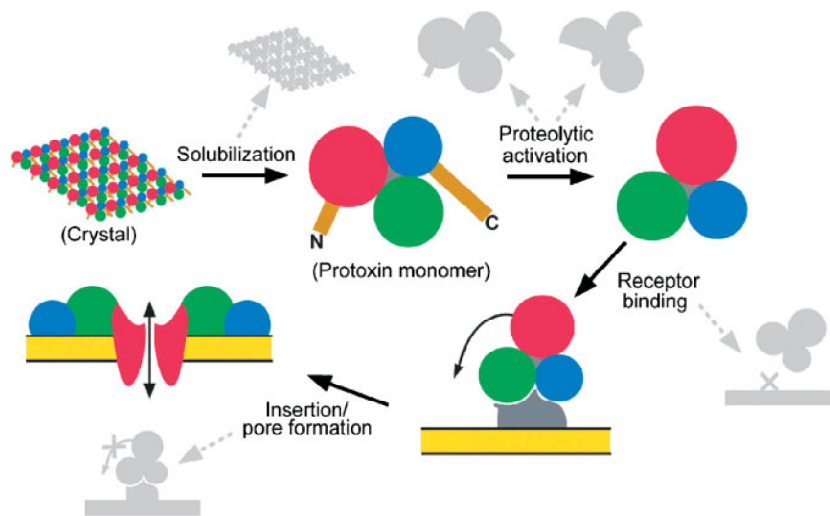


Figura 5 IN. Generalidades en el mecanismo de acción de las TFP. Todas las TFP comparten pasos generales: solubilización, activación proteolítica, unión a un primer receptor, cambio conformacional a oligómero, inserción en la membrana y formación de poro. El fallo de cualquiera de ellos puede causar resistencia a la toxina Cry.

Dependiendo del número de poros formados la membrana celular, las concentraciones intra y extracelulares de pequeños solutos (el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y el decremento del  $\text{K}^{+}$  intracelular) pueden llegar a equilibrarse generando un desbalance osmótico, un flujo descontrolado de agua, cambio en la turgencia y ruptura celular. Las TFP se valen de la disrupción celular y el daño tisular extenso del huésped, para facilitar la propagación del microorganismo a través del tejido y/o la liberación de componentes celulares que pueden servir como nutrientes.

#### Efectos de las TFP en sus células blanco.

Las TFP comprometen la integridad de la célula debido a que su inserción en la membrana plasmática provoca un desbalance iónico e hídrico que conlleva a lisis celular, sin embargo estudios recientes han propuesto que éste es un modelo simplificado. Se ha demostrado que el daño producido en las células por la formación de un determinado número de poros iónicos puede disparar distintas cascadas de señalización. La

formación subletal de poros desencadena sistemas de alerta en la célula blanco para protegerse ante las TFP; según los recursos disponibles en cada célula, ésta es capaz de responder antes del daño irreversible por choque osmótico, lo que significa que según la célula blanco, las concentraciones de toxina y también del tiempo de exposición el efecto de la TFP pueden variar y así sobrevivir al ataque de determinada toxina (Aroian y Van der Goot, 2007).

Existen distintos reportes que confirman a las TFP como estímulos de la muerte apoptótica, oncosis y piropoptosis, así como elementos que disparan mecanismos de supervivencia, de los cuales muchos tienen en común la participación de la ruta de p38 (Gonzalez, 2002).

### **Mecanismos de respuesta celular eucariota.**

#### **Respuesta general a estrés y participación de las MAPK.**

Las células eucariotas tienen distintos recursos para responder a una gran cantidad de estímulos bióticos y abióticos. De manera particular, la respuesta general a estrés representa uno de los retos celulares de mayor relevancia fisiológica (Kultz, 2004). El análisis funcional del proteoma de la respuesta celular de distintos organismos, ha evidenciado que la respuesta a estrés es un mecanismo universal de defensa celular orquestado por proteínas de respuesta conservadas filogenéticamente, que pueden ser consideradas como el “proteoma mínimo de respuesta al estrés”. La identificación de las proteínas protagónicas de respuesta celular ha rendido información sobre aspectos clave de la respuesta celular, tales como, los mecanismos que detectan el daño al DNA, las proteínas y los lípidos del hospedero, así como los mecanismos de estabilización y reparación. Por lo tanto, la respuesta celular al estrés no es específica, pues las células monitorean daño a nivel macromolecular, sin importar el tipo de estrés que causó el daño celular. Adicionalmente, las células “cuantifican” el estrés llegando al extremo de activar programas de muerte celular cuando los niveles de tolerancia han sido excedidos (Kultz, 2004).

Dada la diversidad de cambios contra los que la célula eucariota tiene que contender, no resulta sorprendente que el 5% de su genoma esté dedicado a la construcción y mantenimiento de la infraestructura que permite la respuesta rápida y apropiada a las

alteraciones en su entorno. Dicha respuesta depende de redes elaboradas de moléculas, que actúan como un cableado celular para controlar y diseminar información consecuente de los estímulos extracelulares, este trabajo lo desempeña esencialmente una sola clase de enzimas, las cinasas de proteínas. La función de estas proteínas es la de transferir el fosfato terminal de la molécula de ATP hacia otras proteínas en residuos de alguno(s) de los tres aminoácidos: serina, treonina o tirosina; el proceso contrario (la defosforilación), lo realizan las fosfatasas de proteínas, que catalizan la hidrólisis del grupo fosfato desde el aminoácido blanco.

El mecanismo reversible de fosforilación de una proteica es esencial en la regulación de la actividad enzimática y la señalización intracelular, principalmente por dos razones: el estado de fosforilación de una proteína sustrato refleja su actividad relativa y porque esta modificación postraduccional elicit múltiples efectos en la proteína sustrato de manera transitoria y reversible. Adicionalmente, muchas proteínas sustrato pueden ser fosforiladas en múltiples aminoácidos y cada fosforilación puede afectar a la proteína en distintas propiedades, tales como: la actividad enzimática, la especificidad, la estabilidad, la asociación con otras proteínas y la localización subcelular (Wishart y Guan, 2005). Las cinasas de proteínas son diversas en cuanto a sus pesos moleculares, ya que oscilan entre los 34 KDa (ejemplo: cinasas dependientes de ciclina) hasta >700 KDa (ejemplo: cinasas gigantes como Titina o Twitchina), sin embargo, la familia de cinasas de proteínas ha sido dividida en subclases por la función enzimática que poseen de la siguiente forma: Cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos (ejemplo: cinasas de proteína cinasa A o PKA y cinasas de proteínas G o PKG); las cinasas dependientes de diacilglicerol (PKC); las cinasas dependientes de ciclinas (CDK2) y las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), las cuales además de responder a mitógenos, responden a diferentes tipos de estrés. Particularmente, en función del estímulo al cual responden, las MAPK se subdividen en 3 grupos: ERK (extracellular signal-regulated kinase; cinasas reguladas por señales extracelulares), SAPK/JNK (Stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase; cinasas activadas por estrés/ c-Jun NH2-kinasa terminal) y p38 MAPK las cuales responden principalmente a estímulos asociados a estrés, en los que se incluyen la hiperosmolaridad, y el choque térmico, entre otros (Woodgett y Takahash, 2006). Además de su función celular, otra característica distintiva de las cinasas es su

limitación a ser fosforiladas en residuos de tirosina, serina o treonina. Las MAPK están tipificadas por requerir fosforilación de cinasas en 3 niveles, constituyendo una cascada de cinasas: MAPKKK, MAPKK y MAPK. Los respectivos miembros de la ruta de p38 MAPK son nsy, sek y pmk (o p38). Las MAPK tienen entre sus objetivos finales factores transcripcionales, de hecho, muchas MAPK se translocan del citoplasma al núcleo después de ser fosforiladas y de esta manera pueden modular la expresión genética. La especificidad de las distintas rutas de las MAPK se mantiene por la existencia de proteínas de andamiaje, que pueden conectarlas en la secuencia precisa para transmitir señales particulares. La cinasa p38 posee al menos 3 objetivos nucleares, éstos son CHOP, ATF2 y ELK1. El hecho de que las rutas de señalización no sean circuitos simples, sino que puedan divergir, interconectarse, amplificarse, etc., contrasta con el hecho de que los sustratos al final de la ruta de señalización sean pocos y muchas veces los mismos para diferentes rutas. Ésto representa una paradoja: ¿Por qué elaborar intrincadas y complejas conexiones de señalización para terminar invariablemente en los mismos blancos? La respuesta está dada porque dependiendo de la señal, los factores transcripcionales pueden estar fosforilados en distintos residuos de aminoácidos, así mismo, proteínas adicionales también pueden ser fosforiladas para regular la maquinaria transcripcional y generar una amplia gama de respuestas de distintas magnitudes (Woodgett y Takahashi 2006).

#### Mecanismos de defensa desarrollados por las células eucarióticas para contender con infecciones bacterianas: El Sistema Inmune innato.

La respuesta inmune innata es un evento temprano en la evolución de los eucariotas, que involucra el reconocimiento de patógenos mediado por los receptores de patrones moleculares (PRR) que reconocen características generales de los microorganismos. Los patógenos comparten entre sí patrones moleculares, PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) presentes en su membrana plasmática, sus endosomas y su citoplasma. Algunos de los PAMPs más comunes son la flagelina, el lipopolisacárido y el peptidoglicano, todos ellos capaces de ser sensados por los PRR. Estos receptores, que están muy conservados evolutivamente, incluyen a los receptores tipo Toll (Toll-like receptors), receptores tipo Nod (Nod-Like Receptors/NLR) y receptores tipo gene-I

inducibles por ácido retinóico (retinoic acid-inducible gene-I-like receptors). Todos estos receptores tienen diferentes dominios citoplasmáticos responsables de transducir las señales en el interior celular (Honeyman y Harrison, 2004; Huw, 2008). Las señales que desencadenan los PAMPs están sujetas a ser transducidas por vías de señalización tales como la TLR/ Toll; la TNF- $\alpha$ / Imd y la JAK/STAT/Hop (Pinheiro y Ellar, 2006). Estas vías tienen en común además de proteínas receptoras, proteínas adaptadoras, cinasas de serina-treonina, MAPK, factores transcripcionales, etc.

La respuesta inmune innata permite a las células eucarióticas tener una respuesta de amplio espectro de manera rápida. El sistema inmune de los organismos eucariotas comprende el ensamblaje y la interacción de células y moléculas solubles (humorales). Los principales componentes celulares son los macrófagos y las células dendríticas (Akira, 2006); los componentes humorales son extracelulares, tales como las enzimas del complemento el cual comprende a más de 30 proteínas presentes en el plasma y la superficie celular (Honeyman y Harrison, 2004). La activación de las enzimas del complemento desencadena la opsonización y la muerte de los patógenos mediante la formación de un poro en la membrana, denominado MACPF, que resulta en la lisis de patógenos (Huw, 2008). El conocimiento de las bases moleculares y funcionales de los mecanismos de defensa que los artrópodos ante agentes infecciosos es mucho más reciente que el conocimiento sobre el sistema de respuesta inmune de mamíferos

El modelo principal para estudiar a los insectos ha sido *Drosophila melanogaster*; los datos obtenidos sobre los componentes de su sistema inmune se han podido generalizar a otros artrópodos. En este organismo, se han detectado 3 niveles de respuesta inmune: el humoral, el celular y el de melanización (Medzhitov y Janeway 2002).

La respuesta humoral es dependiente de la producción de péptidos antimicrobianos en el cuerpo graso (equivalente al hígado de mamíferos), algunos péptidos reportados para *D. melanogaster* son Drosomicina, Metchnikowina, Cecropina, Defensina, Attacina, Dipterocina y Drosocina (Bulet *et al.*, 1999; Meister *et al.*, 2000).

La respuesta celular involucra a los fagocitos a los hemocitos y a los plasmocitos, los cuales son células tipo macrófago. Los lamelocitos encapsulan componentes de parásitos (ejemplo: huevos) y las células cristalinas proveen las enzimas necesarias para generar la reacción de melanización. La respuesta por melanización está involucrada en

la recuperación de daño (Hoffman y Richchart 2002) y es activada cuando se detecta que alguna barrera celular ha sido dañada o rota. La reacción de melanización está dada por un complejo de proteinasas, proteínas de reconocimiento de patrones y de inhibidores de proteasas que constituyen el sistema activador de la profenoloxidasas. La melanización es controlada por la cascada de las proteasas de serina y se activa en función del reconocimiento de “lo no propio”; las moléculas de melanina cubren y aíslan microorganismos invasores impidiendo la propagación de la infección. Además durante

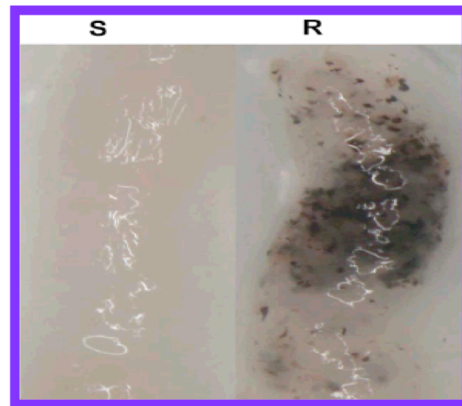


Figura 6 IN. Correlación entre la eficiencia en melanización y la resistencia hacia Bt en *Helicoverpa armigera*. El intestino susceptible (S) a la toxina Cry específica no presenta inducción de melanización al ser infectado. En el caso de un organismo resistente (R) a Cry, su intestino presenta una drástica melanización en respuesta a la infección con Bt.

la síntesis de la melanina se generan intermediarios tóxicos como las especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden combatir la infección. Como un ejemplo, la melanización elevada en intestinos de larvas *Helicoverpa armigera* correlaciona con individuos resistentes a Bt (Ga, 2005; Figura 6 IN.).

#### Efectos intracelulares inducidos por TFP.

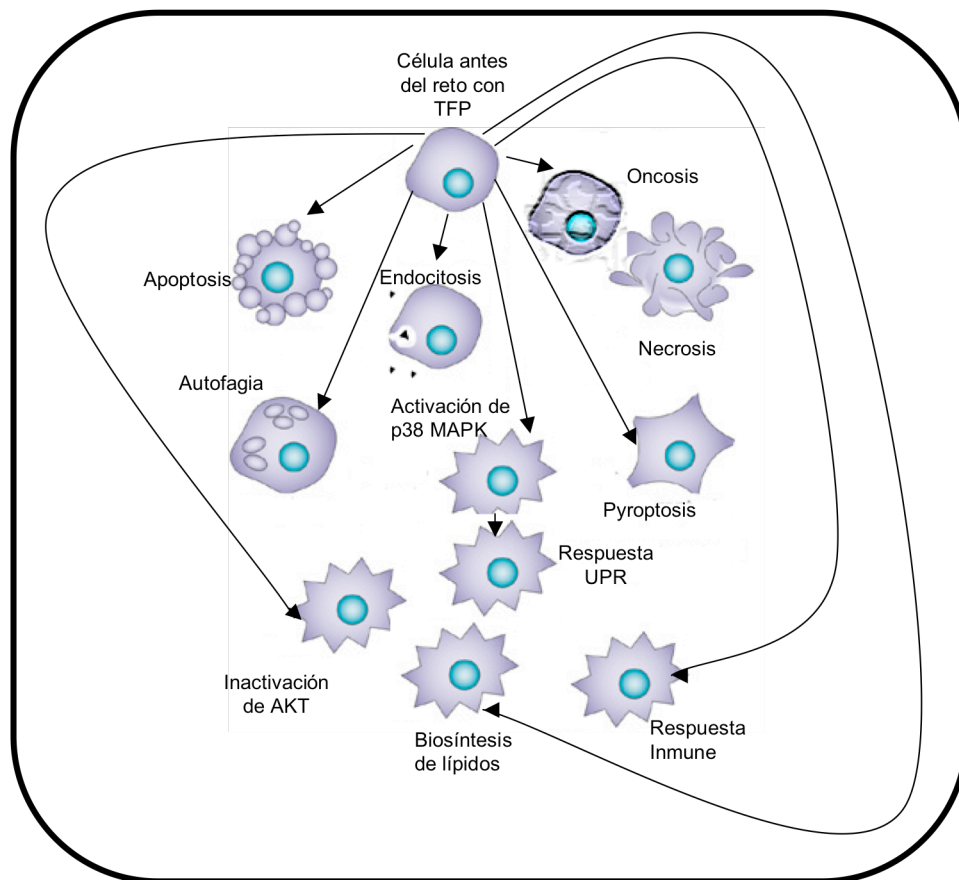
Diversos reportes han resaltado los efectos heterogéneos (Figura 7 IN.) que puede tener una misma toxina sobre distintos tipos celulares y/o a distintas concentraciones.

Las células del sistema inmune, como los linfocitos o las células dendríticas, producen numerosas moléculas inflamatorias en respuesta a TFP, que pueden desencadenar apoptosis. Por ejemplo: los mensajeros químicos interleucinas IL-8 y IL-1 $\beta$ , son



inducidos después de que las células son retadas con  $\alpha$ -toxin, aerolisina y pneumolisina (PLY) de *Streptococcus pneumoniae*, y Listeriolisina (LLO) de *Listeria monocytogenes*. Por otro lado, el factor de necrosis tumoral TNF- $\alpha$ , es inducido en algunas células inmunes después de ser tratadas con aerolisina y estreptolisina O (SLO) de *Streptococcus*, igualmente, la prostaglandina E2 es inducida por células intoxicadas con aerolisina.

Figura 7 IN. Escenarios posibles de la respuesta celular eucariota inducida por TFP. Existen distintos



destinos celulares determinados por la célula blanco, por la toxina formadora de poro y por la concentración y tiempo de exposición. Algunos de ellos dirigen a la muerte celular (programada o necrótica) o a la supervivencia.

Las células no inmunes, como las epiteliales, responden mediante la formación de vacuolas a la presencia de TFP. Así mismo, la permeabilización parcial de la membrana, puede desencadenar rutas que provoquen un destino celular distinto al de la

muerte por necrosis; es decir; la muerte celular no es una consecuencia inevitable de la formación de poro. Las células pueden recuperarse de un número limitado de lesiones en su membrana ocasionados por TFP (Thelestam y Møllby, 1983; Valeva, 2000), es decir, las TFP pueden disparar vías relacionadas con la sobrevivencia o la muerte celular altruista, (Cancino-Rodezno *et al.*, 2010).

### **Respuestas intracelulares eucariotas inducidas por TFP: Mecanismos de muerte y defensa celular.**

#### **Apoptosis inducida por concentraciones subletales de toxina.**

La apoptosis es una forma de muerte celular, considerada altruista, que está regulada genéticamente y se le conoce como muerte celular programada. La célula que muere por apoptosis empaqueta su contenido citoplasmático, lo que evita que se produzca el proceso inflamatorio característico de la muerte por necrosis. La célula que presenta apoptosis posee características morfológicas concretas, tales como condensación del núcleo y citoplasma, pérdida de la integridad del citoesqueleto y fragmentación celular (Fink y Cookson, 2005).

La ruta que dirige hacia la muerte apoptótica implica la activación de una cascada metabólica que comienza con la activación de proteasas, denominadas caspasas iniciadoras (caspasas 2, -8, -9 y -10), las cuales a su vez activan a las caspasas efectoras (caspasas 3, -6 y -7), enzimas encargadas de lisar distintos sustratos que inducen las características morfológicas y bioquímicas que definen a la apoptosis: la activación de DNAsas que cortan entre los nucleosomas (generando un patrón de DNA en “escalera” al ser visto en un gel de agarosa) y la despolarización del citoesqueleto (Fink y Cookson, 2005).

Algunas TFP pueden inducir un efecto “dual” en función de su concentración y el tiempo de exposición: la oncosis o la apoptosis pueden presentarse pasado el “umbral de toxicidad” y a dosis subletales y/o tiempos cortos la célula puede responder por mecanismos de sobrevivencia (Tabla 3 IN.).

Tabla 3 IN. Respuestas celulares inducidas por TFP en distintos blancos.

Toxina	Respuesta celular	Concentración	Tipo celular	Características	Referencia
PVL	Apoptosis	5 nM	neutrófilos,	Activación de las	Genestier
The Panton-Valentine Leukocidins de <i>Staphylococcus aureus</i>	Necrosis	200 nM	monocitos Macrófagos	caspasas-3, -9, condensación de cromatina	<i>et al.</i> , 2005
CPE enterotoxina de <i>Clostridium perfringens</i>	Apoptosis	1 mg/ ml	CaCo-2	Fragmentación de DNA, condensación de cromatina.	McClane y Chakrabart, 2004
	Oncosis	10 mg/ml		Activación de caspasas-3, -7 Partición de DNA al azar.	
SLO estreptolisina O de <i>Streptococcus</i>	Piroptosis	1-16 mg/ml	Macrófagos	Activación de la caspasa -1	Timmer <i>et al.</i> , 2008
PLY pneumolisina de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Apoptosis	0.5 mg/ml	Neuroblastoma endotelial	p38 MAPK activa caspasas -3, -6 y-9, Fragmentación de DNA, condensación de cromatina .	Guessan <i>et al.</i> , 2005 Stringaris <i>et al.</i> , 2002
	Piroptosis	0.1 mg/ml	Macrófagos	Activación de caspasa-1, IL-1a, IL--1b, IL-18	Shoma <i>et al.</i> , 2008
Leucotoxina de <i>Mannheimia haemolytica</i>	Apoptosis	0.2 U <sup>a</sup>	Leucocitos	Inhibición de la activación de Akt	Atapattu and Czuprynski, 2005
HlyA haemolisina de <i>Vibrio cholerae</i>	Apoptosis	Sublítica	Neutrófilos, linfocitos- T	Inactivación de Akt por fosfatasas específicas	Wiles <i>et al.</i> , 2008
Aerolisina de <i>Aeromonas hydrophila</i>	Apoptosis	Dosis sublítica	T-linfomas	Fragmentación de DNA	Nelson <i>et al.</i> , 1999
	Necrosis	Dosis alta	Leucocitos,	Inactivación de Akt	Wiles <i>et al.</i> , 2008

Toxina	Respuesta celular	Concen-tración	Tipo celular	Características	Referencia
Antrax LT de <i>Bacillus anthracis</i>	Piroptosis	1mg/ml	macrófagos	caspase-1, activación de citocinas , ruptura de DNA	Fink <i>et al.</i> , 2008
Cry1Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i>	Oncosis	180 nM	Línea celular High Five	Activación de la adenil ciclasa, la proteína G y la ruta PKA	Zhang <i>et al.</i> , 2006
Parasporina1 de <i>Bacillus thuringiensis</i>	Apoptosis	1-10 mg/ml	HeLa	Activación de la caspasa-3	Katayama <i>et al.</i> , 2007
Neumolisina, $\alpha$ -hemolisina, SLO, antrolisina	Sobreviven cia	Sublítica	Células epiteliales humanas	Fosforilación de p38 y producción de IL-8	Ratner <i>et al.</i> , 2006
Aerolisina	Reparación de la membrana	Sublítica	Células CHO, Hámster	Activación de SREBP y metabolismo lipídico	Gurcel, et al 2006

#### Muerte celular por piroptosis inducida por TFP.

La piroptosis es una variante de muerte celular programada que involucra inflamación y que es dependiente de caspasa-1, en la piroptosis existe ruptura de DNA de manera estocástica. Este fenómeno requiere de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-18) y del complejo multiprotéico inflamosoma (Ferandes-Alnemri 2007). Diferentes TFP activan la piroptosis en ciertas células blanco (Tabla 3 IN.).

#### Muerte celular por oncosis inducida por TFP.

La muerte por oncosis sobreviene cuando agentes tóxicos provocan un déficit considerable de ATP celular, ya sea por interferencia de la generación de ATP celular o porque la toxina cause una elevación desmesurada en el consumo de ATP. También los niveles alterados de Ca<sup>+2</sup> pueden ser responsables de la muerte oncótica que tiene por característica ser una respuesta de naturaleza inflamatoria, varias TFP inducen oncosis, pero en la literatura sólo hay un modelo que explica el mecanismo preciso por el que una toxina de este grupo (Cry1Ab de Bt) induce oncosis en la línea celular High Five (Zhang *et al.*, 2006).

### Activación de biosíntesis de lípidos.

Algunas células responden a las TFP activando reguladores de la biogénesis de membrana (Gurcel *et al.*, 2006). Se observó que en células de ovario de hámster Chino (CHO) y células HeLa tratadas con aerolisina o  $\alpha$ -toxina (Tabla 3 IN.) da inicio un proceso de salida de  $K^+$  vinculado con el ensamblaje de dos complejos multiprotéicos del inflamósoma (IPAF y NALP3), éstos a su vez activan a la caspasa-1. La caspasa-1 dispara la exportación del regulador central del metabolismo de lípidos denominado elemento de respuesta a esteroides para unión de proteínas (sterol responsive element binding proteins-SREBP), desde el retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi, donde SREBP es activado por proteasas. Una vez activado el SREBP funciona como un factor de transcripción capaz de migrar a núcleo promoviendo la expresión de genes involucrados en la biogénesis de membrana. La previa formación de poro es necesaria para la activación del SREBP y ésta activación de síntesis de lípidos correlaciona directamente con la sobrevivencia celular (Gurcel *et al.*, 2006; Tabla 3 IN.).

### Eliminación de TFP por mecanismos endocíticos.

Cuando la membrana plasmática eucariota ha sido dañada mecánicamente, se inicia un proceso que involucra exocitosis dependiente del flujo transitorio de  $Ca^{2+}$ . Se ha propuesto que la membrana intracelular es transportada rápidamente en vesículas hacia la superficie celular y mediante fusión con la membrana externa se restaura la integridad celular (McNeil y Kirchhause 2005). Este tipo de defensa celular no repara de forma estable el daño transmembranal hecho por TFP, de hecho, ha sido demostrado que el daño causado por estas toxinas requiere de otros procesos adicionales a la exocitosis. Hay dos diferentes mecanismos que participan en la reparación de la membrana: Si la toxina forma un poro permeable para  $Ca^{2+}$ , en función del tamaño del orificio, la lesión puede ser reparada por endocitosis para remover a la toxina mediante endosomas (Idone *et al.*, 2008). Este mecanismo endocítico es dependiente de dinamina, la cual puede ser inhibida específicamente por dinasora impidiendo la recuperación de los niveles de ATP después de la permeabilización, promoviendo así, la muerte celular (Husmann *et al.*, 2009). En contraste, las TFP que generan orificios celulares no

permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ , son removidas mediante la internalización del complejo de poro, que luego retorna al medio como una estructura exosomal denominadas toxosomas (Husmann *et al.*, 2009), (Schorey y Bhatnagar 2008).

#### La autofagia como mecanismo de protección.

La autofagia es considerada una respuesta del sistema inmune innato que actúa en el espacio intracelular en los fagosomas, restringiendo la infección. La autofagia secuestra a los patógenos en el autofagosoma, para su posterior degradación por lisosomas (Deretic, 2006). La formación del autofagosoma es inducida a bajas concentraciones de toxina (Gutierrez *et al.*, 2007).

#### Activación de la ruta de MAPK/p38.

La participación de la vía de p38 es protagónica en la respuesta celular eucariota contra el ataque articulado por distintas TFP. Ésta ha sido demostrada en numerosos trabajos (Kloft, 2009; Kim, 2002; Stringaris, 2002; Stassen, 2003; Sifri, 2003; Husmann, 2006) y adicionalmente los miembros de la ruta de p38 también han sido reportados por estar implicados en otras respuestas de tipo inmune inflamatoria, apoptótica, de proliferación celular y de diferenciación, así como regulación de la expresión de factores de transcripción y receptores de superficie celular (Herlaar, 1999; Ono, 2000).

Repetidamente se ha demostrado que después de la exposición a bajas concentraciones de distintas toxinas, las células epiteliales se defienden de las TFP por la activación de la vía de p38 (detalles en antecedentes).

#### Sistema de eliminación de proteínas mal plegadas.

La activación de p38 posterior al reto con Cry5 o aerolisina en modelos como *Caenorhabditis elegans* y células HeLa, respectivamente, se relacionó con una respuesta de estrés ubicada en el retículo endoplásmico: sistema de respuesta a proteínas no plegadas (UPR del inglés Unfolded Proteins). Esta respuesta se da para mantener la homeostasis, protegiendo a la célula de la acumulación de proteínas no plegadas durante el proceso de intoxicación. (Bischof *et al.*, 2008).

## ANTECEDENTES.

Cuando las TFP están presentes en concentraciones altas, las células no pueden contender con la intensa actividad formadora de poro en la membrana plasmática y mueren rápidamente por oncosis o necrosis, debido a la descompensación iónica por los cambios en la permeabilidad de la membrana. En contraste, cuando las TFP están en concentraciones bajas o sub-líticas, las células tienen diversas estrategias para responder en contra de ellas y fomentar la supervivencia. Dentro de estas estrategias, destaca la activación de la respuesta a estrés dirigida por MAPK/p38. Debido a que la formación de poro es un evento estresante para la célula, es esperable que los sistemas de respuesta a estrés celular se activen por la exposición a TFP. En *D. melanogaster* se ha demostrado que esta vía es indispensable para generar respuestas ante choque osmótico, activación de sistema inmune, etc. (Craig *et al.*, 2004). En otros sistemas, como el de células epiteliales tratadas con concentraciones bajas de distintas TFP, se ha visto que inicia una respuesta inmune temprana dirigida por la activación de la vía MAPK/p38, el estrés osmótico producido por la formación de cierto número de poros en las membranas de las células blanco, induce una respuesta de fosforilación de MAPK/p38 que es crucial para prevenir la consecuente infección bacteriana (Ratner *et al.*, 2006).

En organismos completos de *C. elegans* tratados con la toxina Cry5B de Bt (Huffman *et al.*, 2004; Figura 1 A.) se demostró la participación de la vía de p38 en respuesta al tratamiento con la TFP específica. En estos nematodos se silenciaron los 3 elementos de la cascada modular de cinasas: *pmk*, *sek* y *nsy*. Y los autores demostraron que esta vía es indispensable para la respuesta inmune hacia las toxinas, Cry5B, ya que todos los organismos silenciados resultaron hipersensibles hacia Cry. A la par, otros trabajos demostraron que otras TFP, como la aerolisina, pneumolisina, estreptolisina, hemolisina- $\alpha$  de *S. aureus* y antrolisina O de *B. anthracis*, también inducen una respuesta MAPK/p38 en células epiteliales de hígado de hámster juvenil y células hepáticas de embrión humano, cuando las toxinas bajo estudio se aplicaron en dosis bajas (Huffman *et al.*, 2004; Ratner *et al.*, 2006). Así mismo, se demostró que concentraciones del orden nM de estas toxinas no son suficientes para causar citólisis, pero sí para iniciar una respuesta pro-inflamatoria al inicio de la infección, que promueve la supervivencia celular. Es

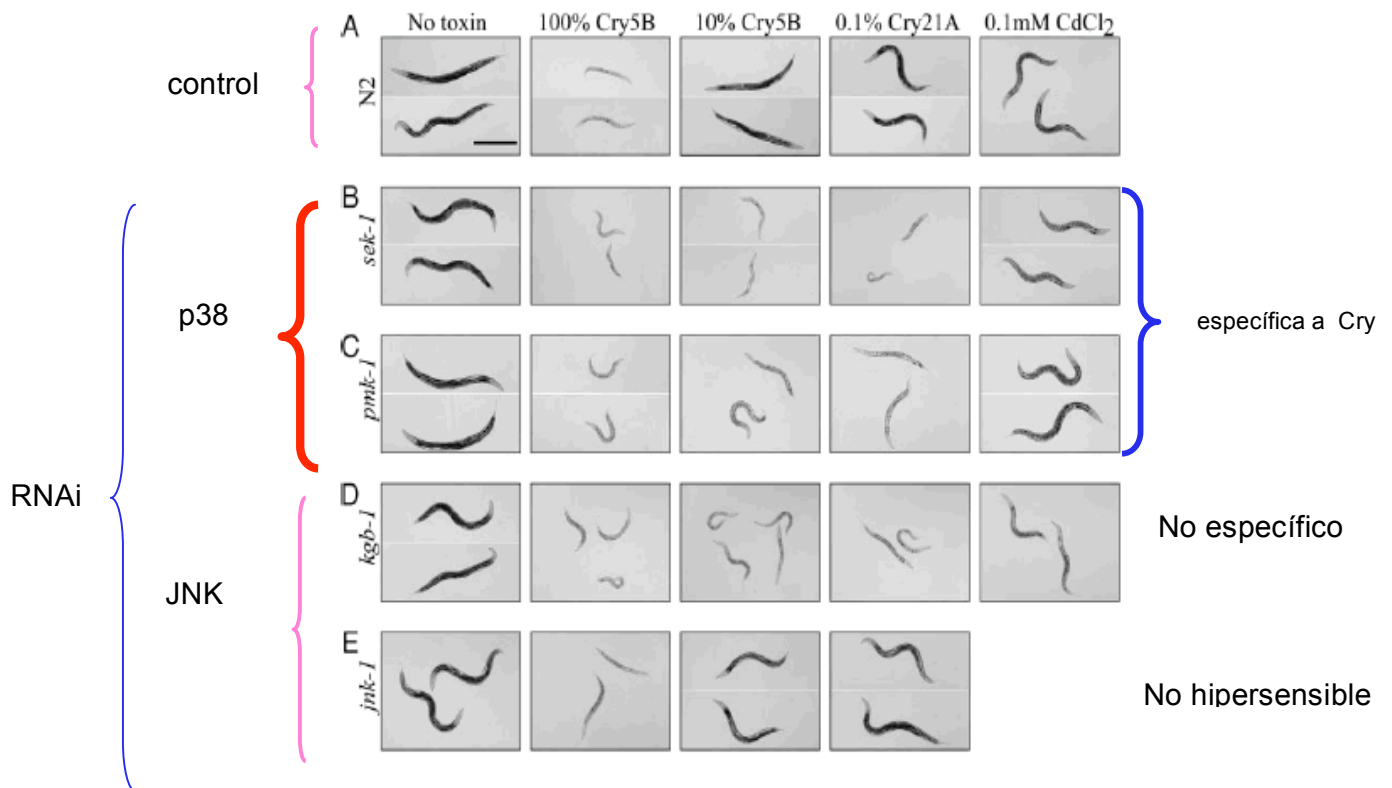


Figura 1 A. Respuesta de los nemátodos silenciados en distintas MAPK a la intoxicación con Cry. Los bioensayos hechos en organismos silenciados en MAPK con la Cry 5B al 100% y al 10% de concentración letal y con el 0.1% de la concentración letal de Cry21A mostraron que los miembros de la ruta de p38 MAPK están involucrados en la respuesta de defensa hacia toxina Cry, que no todos los miembros de JNK-MAPK examinados están implicados en supervivencia hacia Cry.

importante mencionar que la fosforilación de MAPK/p38 observada en distintos trabajos, correlaciona con la actividad formadora de poro de las toxinas estudiadas y que las TFP que presentan mutaciones puntuales en regiones esenciales para la actividad formadora de poro, son incapaces de inducir la activación de p38. Además, tratamientos con PFT en presencia de osmolitos de alto peso molecular, como el dextrán, capaces de tapar el poro o compuestos quelantes de Calcio, tales como EGTA, inhibieron la respuesta de p38 sugiriendo que el estrés osmótico es sentido por p38 a través del flujo de  $Ca^{2+}$  resultante de la formación de poro (Ratner *et al.*, 2006).



La activación de MAPK/p38 en *C. elegans* o en células HeLa después del tratamiento con Cry5 y aerolisina, respectivamente, inducen el fenómeno UPR. El sistema UPR se dispara por la acumulación de proteínas desorganizadas durante la intoxicación con toxinas e incrementa la biosíntesis de fosfolípidos. Una de las ramas de transmisión de señales que activa la respuesta UPR, llamado brazo *ire-1*, se activa específicamente por MAPK/p38 después de tratar al nemátodo *C. elegans* con la TFP Cry5. (Bischof *et al.*, 2008). La función protectora de la vía MAPK/p38 que dispara una respuesta de supervivencia, también se observa en células epiteliales humanas (HaCaT) y en mastocitos, después del tratamiento con toxina- $\alpha$  o estreptolisina (Husmann *et al.*, 2006; Stassen *et al.*, 2003). El tratamiento de las células HaCaT con toxina- $\alpha$  a concentraciones menores de 10 ng/mL, activa la fosforilación de MAPK/p38. MAPK/p38 regula positivamente la expresión de los mRNA de citocinas como TNF- $\alpha$ . La producción TNF- $\alpha$  juega un papel importante en la defensa del hospedero en el modelo de murino, ya que recluta las células inflamatorias que tienen funciones críticas en el sistema inmune innato (Stassen *et al.*, 2003). La síntesis de TNF- $\alpha$  en mastocitos también se induce por otra TFP, la listeriolisina. (Gekara *et al.*, 2007). Las células no inmunes, como las epiteliales, vacuolizan en respuesta a las TFP e inducen la activación de MAPK/p38 (Ratner *et al.*, 2006; Husmann *et al.*, 2006; Huffman *et al.*, 2004; Bischof *et al.*, 2008).

En algunos tipos de células, bajas concentraciones de TFP también pueden inducir muerte celular por apoptosis o piroptosis dependiente de p38. Tal es el caso la de pneumolisina, que induce apoptosis en endotelio humano y células de neuroblastoma. La vía de apoptosis fue activada a través de las vías de la MAPK/p38 y JNK. La inhibición de la fosforilación de p38 y JKN redujo la activación de caspasas promotoras de apoptosis (Guessan *et al.*, 2005).

También fue reportado que el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular mediado por los poros de pneumolisina correlacionaba con la activación de MAPK/p38 y la muerte por apoptosis. Ésto se probó cuando se inhibió del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  con quelantes y la actividad de la MAPK/p38 con el inhibidor SB203580, ambas inhibiciones rescataron a las células neuronales de la muerte, sugiriendo que los poros de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por pneumolisina, activan la respuesta de la MAPK/p38 y correlacionan con la muerte por apoptosis (Stringaris *et al.*, 2002).

### **HIPÓTESIS:**

Existe una respuesta celular por parte de los insectos hacia las toxinas Cry. Dicha respuesta está mediada por proteínas conservadas en los eucariotes para contender con el estrés y/o los patógenos (como la ruta de MAPK/p38), así como por proteínas implicadas en la respuesta particular de los insectos hacia el estrés y/o los patógenos.

### **OBJETIVO GENERAL:**

**Caracterizar la respuesta intracelular de insectos hacia la exposición a toxinas de Bt.**

Objetivo particular 1. **Analizar la participación de la vía de las MAPK/p38 en la respuesta a la intoxicación con toxinas Cry en modelos *in vivo* de larvas de *Manduca sexta* y *Ae. aegypti*.**

Objetivo particular 2. **Identificar proteínas involucradas en la respuesta de las células del intestino de *Ae. aegypti* ante la intoxicación específica con Cry11Aa.**

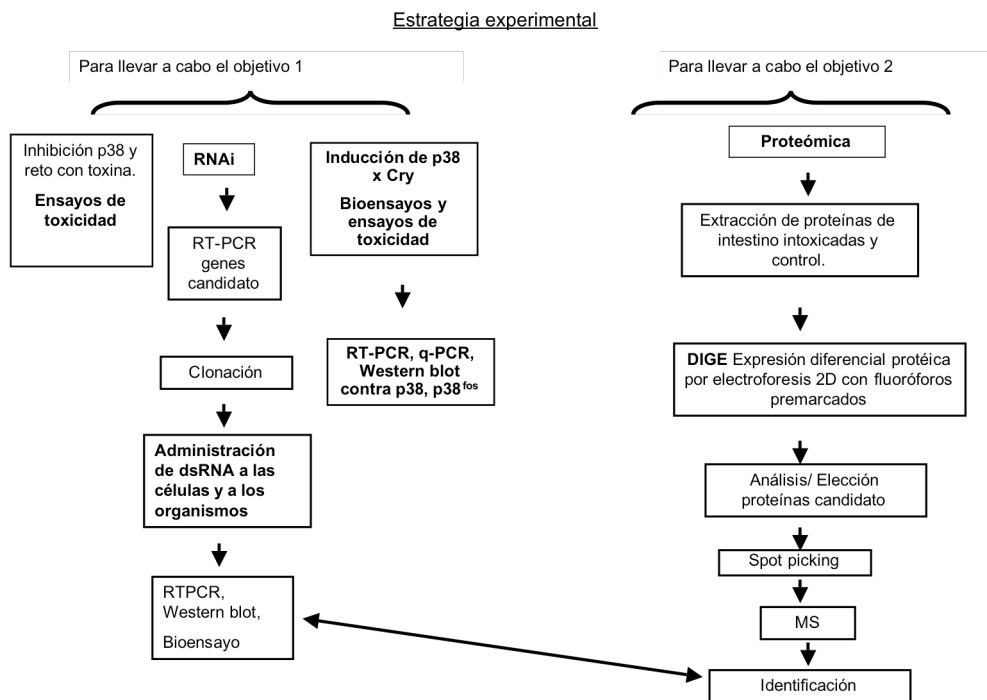


Figura 1 M.M. Diagrama de flujo de las estrategias experimentales.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### **Purificación de cristales de Bt (Cry11Aa y Cry1Ab).**

Las cepas de Bt portadoras de los plásmidos pHT315-Cry1Ab o pCG6-Cry11Aa se crecieron a 30°C en medio de esporulación con 10 mg/mL de eritromicina (Meza *et al.*, 1996). Las inclusiones cristalinas se verificaron mediante contraste de fases al microscopio, posteriormente fueron purificadas por gradientes de sacarosa (Thomas y Ellar, 1983). Las mutantes Cry1Ab-R99E (Jiménez-Juárez *et al.*, 2007) y Cry11Aa-R90E (Muñoz-Garay *et al.*, 2009) fueron usadas como controles debido a que sus mutaciones respectivas en la hélice  $\alpha$ -3 las vuelve incapaces de oligomerizar y por tanto inocuas contra su insecto blanco (Tabla 1. M.M y Tabla 2. M.M. en ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS).

Tabla1 M.M. Cepas de Bt silvestres, transformadas o mutantes.

Cepa de Bt	Plásmido	Mutación
israelensis	pCG6-Cry11Aa	-
kurstaky	pHT315-Cry1Ab	-
4Q7	pCG6-Cry11Aa pHT315-Cry1Ab	R90E hélice $\alpha$ -3
407	pHT315-Cry1Ab	R99E hélice $\alpha$ -3

### Crecimiento de líneas celulares de Mosquito.

Las líneas celulares de mosquito previamente establecidas, 4A3A de *Anopheles gambiae* (Muller, 1998) y Mos20 de *Ae. aegypti* (Lycett y Crampton, 1993), se crecieron en 5 ml de GIBCO™ Schneider's Drosophila Medium (1X) (Gibco, Invitrogen) con suero fetal bovino al 10% en cajas de 25 cm<sup>2</sup> a temperatura controlada de 27 °C. Para ensayos de viabilidad las células fueron sembradas en cajas de 96 pozos a alta densidad (50,000 células/pozo) (protocolos adicionales en ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS).

### Ensayos de toxicidad.

Para ensayos de viabilidad de las líneas celulares se usó a la toxina Cry11Aa activada (ver apéndice de material y métodos) en distintas concentraciones 0, 5, 20, 30, 40 y 50 nM) y como control positivo de muerte (Tritón al 0.1%). El homodímero de etidio (EthD-1 de Molecular Probes, Invitrogen, EUA) en la concentración recomendada por el fabricante se empleó como indicador de muerte celular. Se adquirieron las imágenes en un microscopio invertido en 10X en el canal rojo de fluorescencia con la cámara Nikon Coolpix 4500, apertura 3.1 y exposición 0.5 s (Nikon). Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa Image J (NIH) (protocolos adicionales en ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS).

### Bioensayos.

#### M. sexta.

Para los bioensayos se usaron suspensiones de espora-cristal correspondientes a Cry1Ab silvestre y mutante. Distintas concentraciones ( de 0 a 2000 ng/cm<sup>2</sup>) en un volumen de 35 mL fueron aplicadas en la superficie de la dieta colocada en placas de 24 pozo (Gómez *et al.*, 2002). Se adicionó una larva por pozo y al término de 7 días se cuantificó la mortalidad. La concentración letal del 50% de la población se obtuvo procesando los datos por el análisis Probit (Polo-PC LeOra Software). La concentración protéica fue determinada por ensayo de Bradford (protocolos adicionales en ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS).

#### Ae. aegypti.

Para bioensayos de *Ae. aegypti* se emplearon concentraciones finales de espora cristal de Cry11Aa silvestre y mutante, desde 0 a 10,000 ng/mL. La toxina fue añadida a un volumen de 100 mL de H<sub>2</sub>O que contenía 10 larvas de cuarto instar.

Después de 24 h se evaluó la mortalidad de la población ensayada (McLaughlin *et al.*, 1983).y la LC<sub>50</sub> se estimó mediante los datos descargados en el programa Probit analysis

(Polo-PC LeOra Software) (protocolos adicionales en ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS).

### **RT-PCR y PCR cuantitativo.**

El RNA total fue aislado mediante el RNeasy Kit (Qiagen). Un microgramo de cada muestra se usó como templado para la RT-PCR usando el First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV, Roche). Los oligonucleótidos específicos (Tabla 3. M.M.) se diseñaron para amplificar a p38 de *Ae. aegypti* y *M. sexta* y sek de *A. gambiae*.

El genoma de *M. sexta* no está secuenciado, para el diseño de los oligonucleótidos se usaron las ESTs generadas del intestino de larvas usando 454 pyro-sequencing (Pauchet *et al.*, 2009).

Para validar los resultados del RT-PCR se realizaron 4 réplicas de muestras biológicas independientes. El PCR cuantitativo sobre material de *M. sexta* se realizó en Eurofins MWG GmbH Germany, ABI 7000 Instrument Amplifluor Detection System (Serologicals Clarkston, GA) <http://www.eurofinsdna.com/products-services/gene-synthesis.html> (protocolos adicionales en ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS).

### **Silenciamiento de genes por RNAi.**

Los fragmentos de cDNA correspondientes a miembros de la ruta de p38 fueron amplificados y luego clonados en el vector TOPO (TOPO TA cloning kit Invitrogen) y subclonado en el vector pLitmus28i (HiScribe™, New England Biolabs, Beverly, MA) que contiene dos promotores T7 flanqueando el sitio de multiclonación. Ambos promotores permiten la amplificación de los fragmentos de interés mediante el oligo T7. El producto de PCR se purificó con QIAquick.

PCR purification kit (Qiagen Valencia, CA). La transcripción *in vitro* de la doble cadena de RNA se hizo con la RNA polimerasa T7 (HiScribe RNAi Transcription Kit, New England Biolabs). Cien larvas neonatas de *M. sexta* fueron alimentadas con 5 µg Ms-p38 dsRNA/ µL. Posteriormente a la ingesta de la gota las larvas neonatas fueron transferidas a una dieta artificial hasta alcanzar el 3er instar. Edad a la que fueron analizadas.

El silenciamiento de p38 en *Ae. aegypti* se realizó sobre 200 larvas neonatas, las cuales fueron alimentadas durante 16 h con 200 µg de dsRNA previamente encapsuladas en Effectene (transfection reagent Qiagen). Los 200 µg de dsRNA fueron llevados a un volumen de 4 mL de buffer EC (DNA-condensation buffer EC buffer Qiagen), posteriormente fueron mezclados con 0.8 mL de Enhancer buffer (Qiagen) y 1.3 mL de Effectene. Al finalizar las 16 h los moscos fueron transferidos a agua limpia y alimentados con dieta (rat food Chow) hasta el cuarto instar (Bayyareddy *et al.*, 2009) edad en la que fueron analizados. Para la transfección de la línea celular con dsRNA-Effectene, se usó el Effectene kit (Qiagen), sobre 50,000 células con suero y medio Schneider's Drosophila Medium (1X) y antibiótico en solución (estreptomicina 1.2 mg/mL) en cajas de 25 cm<sup>2</sup>. Los 50 µg de dsRNA fueron llevados a 50 µL con buffer DNA-condensation (EC) adicionados con 50 µL de Enhancer (Qiagen,) y 60 µL de Effectene. El dsRNA encapsulado fue adicionado a un volumen final de 5 mL de medio de cultivo. El

cultivo tratado se creció a 27°C durante 3 días (protocolos adicionales en ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS).

Tabla 3 M.M. Oligonucleótidos diseñados para amplificar los genes de interés.

Nombre oligonucleótido	Descripción del oligonucleótido	Tm ° C	Secuencia del oligo 5' a 3'
P38MSupper	directo p38 de <i>M.sexta</i> desarrollado sobre contig	58	CCC AAG CTT CGG CCA TAG ACA CTT TGC ATA ATA TG
P38MSlower	reverso p38 de <i>M.sexta</i> desarrollado sobre contig	58	CCG GAA TTC CCG ATT ACA TTT TCA TGG TTC
P38AAupper	directo p38 de <i>Ae. aegypti</i> hecho sobre secuencia de mRNA	55	GAA GAT CTT CGG AAA TCA TGC TCA ACT
P38AAlower	directo p38 de <i>Ae. aegypti</i> hecho sobre secuencia de mRNA	55	GAA GAT CTT CGG GAC GAA ATT AAG TAC
SEKAAupper	directo SEK de <i>Ae. aegypti</i> hecho sobre secuencia de mRNA	52	GAA GAT CTT CGA GGG CGT TTG GA
SEKAAlower	reverso SEK de <i>Ae. aegypti</i> hecho sobre secuencia de mRNA	52	GAA GAT CTT CGG GAC GAA ATT AAG TAC TT
SEKAGupper	directo SEK de <i>A.gambiae</i> hecho sobre secuencia de mRNA	55	CGG ATTCGG AGC TGC ATG GAG GTG ATG GAC
SEKAGlower	reverso SEK de <i>A.gambiae</i> hecho sobre secuencia de mRNA	55	CCC AAG CTT CTG CTT GAG CTG CTG GAA CGG CG
MSACTINupper	directo de actina de <i>Ae. aegypti</i> y <i>M. sexta</i> hecho sobre secuencia consenso de mRNA	50	GTC GAC AAT GGC TCC GGC ATG TGC A
MSACTINlower	reverso de actina de <i>Ae. aegypti</i> y <i>M. sexta</i> hecho sobre secuencia consenso de mRNA	50	TCT GGG TCA TCT TTT CCC TGT TGG CCT TGG GGT
MSRPS3upper	directo SRP3 de <i>M.sexta</i> hecho sobre secuencia de mRNA	52	CCG ATC GGA GAT CAT CAT CAT GGC C
MSRPS3lower	reverso SRP3 de <i>M.sexta</i> hecho sobre secuencia de mRNA	52	CAT CCG CGA GTT GAC TTC GGT CGTC

### Ensayos tipo Western blot.

Los intestinos de larvas fueron disectados y la línea celular fue recuperada para lisarse y obtener proteínas totales. Estas fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Se realizó la inmunodetección según las condiciones y concentraciones de anticuerpo estandarizadas (Tabla 4 M.M.) se reveló usando películas Kodak® X-Omat LS film (protocolos adicionales en ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS).

Tabla 4 M.M. Anticuerpos y condiciones usados para detectar las proteínas de interés.

Proteína a detectar	Anticuerpo Primario	Dilución	Anticuerpo Secundario	Dilución
p38 <i>M.sexta</i> y <i>Ae. aegypti</i>	Sigma Monoclonal anti p38 MAPK non activated antibody produced in mouse	1:10000	HP-Rabbit anti Mouse igG (H+L) Zemed	1:10000
p38 fosforilado <i>M.sexta</i> y <i>Ae. aegypti</i>	Sigma Monoclonal anti p38 MAPK diphosporilated antibody produced in mouse	1:3000	HP-Rabbit anti Mouse igG (H+L) Zemed	1:10000
Tubulina <i>M.sexta</i> y <i>Ae. aegypti</i>	Anti tubuline Zemed	1:2500	HP-Rabbit anti Mouse igG (H+L) Zemed	1:10000

### Electroforesis bidimensional (2D).

El diseño experimental (Tabla 5 M.M.) incluyó 3 muestras (proteínas totales aisladas de los intestinos de larvas de 4o instar de *Ae. aegypti* pre tratadas con la CL designada de Cry11Aa, (CL<sub>10</sub> o CL<sub>50</sub> dependiendo del diseño experimental) la concentración equivalente de Cry1Ab, y sólo Buffer), en 6 réplicas. 50 µg de proteína total por muestra se marcaron con los fluoróforos CyDyes de Amersham G.E. Healthcare (marcaje mínimo CyDye2, CyDye3 y CyDye5) ; las proteínas se mezclaron de manera independiente con 1µL de buffer IPG de pH inmovilizado de 3-10 (Amersham G.E. Healthcare) y el buffer de rehidratación (urea 7M, tiourea 2M, 2% CHAPS w/v, formalito 2% v/v , DTT 40 mM, 0.002% azul de bromofenol), para alcanzar el volumen final recomendado por el fabricante; se realizó el isoelectroenfoco (IEF) (ver Tabla 6. M.M. en ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS). de las tiras con pH inmovilizado para posteriormente equilibrarlas en el buffer de equilibrio BE (Tris/HCl pH 8.8 50 mM, Urea 6 M, Glicerol 30% v/v, SDS 2%, Azul de bromofenol 0.002%) suplementado con DTT (50 mg/5 mL de BE es suficiente para cubrir una tira) y con iodoacetamida (125 mg/5 mL de BE ). La separación

de las proteínas por peso molecular se hizo en SDS PAGE. 15% de acrilamida en buffer de corrida (Tris base 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0.1% w/v). La electroforesis se realizó a 15 mA durante toda la noche.

Concluida la electroforesis bidimensional, los geles con los marcajes fluorescentes fueron escaneados según condiciones señaladas para el escaner Typhoon de Amersham G.E. Healthcare. Las imágenes así obtenidas fueron analizadas para detectar las diferencias significativas en la expresión protéica entre las muestras biológicas expuestas a distintos tratamientos por el software DeCyder (Amersham G.E. Healthcare) Los spots marcados como diferenciales fueron recuperados del gel con el Spot Picker (Amersham G.E. Healthcare). La identificación de péptidos se hizo por espectrometría de masas en la Universidad de Georgia, E.U. (Proteomics Core Facility) (protocolos adicionales en ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS).

Tabla 5 M.M. Esquema general del diseño experimental del Análisis tipo DIGE para el proteoma de intestino de *Ae. aegypti* retado con Cry11Aa

Gel	Cy3 50ug	Cy5 50ug	Cy2 50ug
1	Cry11Aa(1)	Cry1Ab(2)	Estandar interno
2	Cry11Aa(2)	Cry1Ab(3)	Estandar interno
3	Cry11Aa(3)	Control(1)	Estandar interno
4	Cry1Ab(1)	Control(2)	Estandar interno
5	Cry1Ab(2)	Control(3)	Estandar interno
6	Cry1Ab(3)	Cry11Aa(1)	Estandar interno
7	Control(1)	Cry11Aa(2)	Estandar interno
8	Control(2)	Cry11Aa(3)	Estandar interno
9	Control(3)	Cry1Ab(1)	Estandar interno
10 picking	Deep purple	500 ug prot	totales



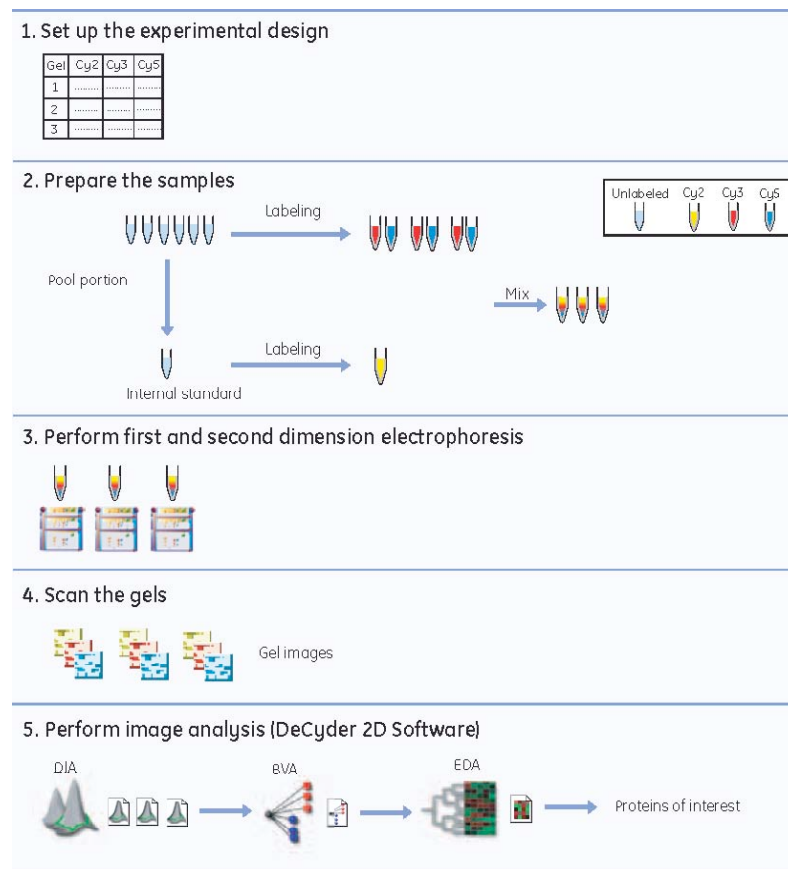


Figura 2 M.M. Diagrama de flujo de la técnica de DIGE. Una vez delimitado el número de muestras a comparar, se marcan con fluoróforos que harán factible el reconocimiento de hasta 3 muestras en un solo gel. Terminada la primera y segunda dimensión se procede a escanear cada muestra de forma independiente la longitud de onda apropiada para cada fluoróforo. El análisis se hace mediante el software DeCyder (Amersham) que indicará a los candidatos protéicos que se expresan diferencialmente bajo el estímulo Cry11Aa.

## RESULTADOS.

**1) Análisis de la sensibilidad de las larvas de *M. sexta* a la toxina Cry1Ab y de *Ae. aegypti* a la toxina Cry11Aa .** Para conocer los valores de LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub> y LC<sub>95</sub> de la toxina Cry1Ab y de la mutante Cry1Ab-R99E afectada en el proceso de oligomerización se realizaron bioensayos con larvas de segundo instar de *M. sexta*. El número de larvas muertas al término de 7 días se relacionó con las concentraciones de toxina mediante el programa Probit analysis, los valores de concentraciones letales de las toxinas de interés para el 50% de la población de *M. sexta* fueron 2 (0.8-4) ng/cm<sup>2</sup> para la toxina Cry1Ab y 2000> ng/cm<sup>2</sup> para la mutante Cry1Ab-R99E (entre paréntesis los límites de confianza 95%) (Tabla 1 R.).

Los bioensayos hechos en larvas de cuarto instar de *Ae. aegypti* usando la toxina Cry11Aa y la mutante R90E hélice  $\alpha$ -3 revelaron las CL<sub>10</sub>, CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub> mediante el uso del programa Probit analysis (Polo-PC LeOra Software). Los resultados correspondientes a las CL<sub>50</sub> fueron de 134 (34-589) ng/mL para la toxina Cry11Aa y de 10,000> ng/ml para la mutante Cry11Aa-R90E, los límites de confianza del 95% se encuentran entre paréntesis (Tabla 1 R.)

Tabla 1 R. Toxicidad de la espora cristal de toxinas Cry silvestres y mutantes contra *Manduca sexta* y *Aedes aegypti*.

Toxina	Insecto	LC <sub>50</sub> (95% límites fiduciales)	incremento en la susceptibilidad
Cry1Ab	<i>M. sexta</i>	2 (0.8-4) ng/cm <sup>2</sup>	1
Cry1Ab	<i>M. sexta</i> Silenciada en p38	0.25 (0.15-0.4) ng/cm <sup>2</sup>	8
Cry1Ab-R99E	<i>M. sexta</i>	>2,000 ng/cm <sup>2</sup>	N D
Cry11Aa-R90E	<i>A. aegypti</i>	>10,000 ng/ml	N D
Cry11Aa	<i>A. aegypti</i>	30 (25-36) ng/ml	1
+ Effectene			
Cry11Aa	<i>A. aegypti</i>	3 (2-4) ng/ml	10
+ Effectene	Silenciado en p38		

<sup>ND</sup> No determinado

**2) Selección de una línea celular de mosquito sensible a Cry.** Para realizar los ensayos de toxicidad con líneas celulares de *A. gambiae* se eligió la toxina Cry11Aa de entre varias toxinas específicas contra dípteros: Cry4A, Cry4B y Cry11Aa en sus versiones activadas. La abundancia y facilidad de obtención de los cristales, así como el rendimiento de la toxina activada y la reproducibilidad en los ensayos de toxicidad fueron los criterios de selección de la toxina Cry11Aa para los ensayos en líneas celulares. La siguiente meta fue elegir entre las líneas celulares 4A3A ó 4A3B de *A. gambiae*, aquella que resultase mas sensible a la toxina Cry11Aa. Para obtener los porcentajes de mortalidad celular resultantes de la exposición a Cry11Aa se realizaron ensayos de fluorescencia (Dead, Molecular Probes, Invitrogen) y el análisis de los resultados se realizó utilizando el programa desarrollado por Roberto Villaseñor (Tesis para obtener el grado de Biólogo bajo la supervisión de la Dra. Alejandra Bravo). Los valores porcentuales relativos fueron obtenidos a partir de las fluorescencias emitidas ( el 0 y el

100% correspondientes al control y al tratamiento con tritón al 0.1% respectivamente). El análisis mostró que la línea celular 4A3A presentó la mayor sensibilidad a la toxina, así como mayor homogeneidad y reproducibilidad en su respuesta. La concentración letal 50 fue igual a 160 nM.

**3) Análisis de la expresión de genes de la ruta de p38.** El diseño de oligonucleótidos para los genes de la vía p38 de *Ae. aegypti* y *A. gambiae* fue facilitada por la disponibilidad de sus genomas (<http://aaegypti.vectorbase.org/index.php> y <http://agambiae.vectorbase.org/index.php>) (Tabla 3 M.M.). Para el caso de *M. sexta*, cuyo genoma no está secuenciado, se recurrió a la base de datos de *Bombyx mori* (<http://silkworm.genomics.org.cn/>) otro lepidóptero cuyo genoma se ha secuenciado recientemente, para el diseño de oligonucleótidos degenerados. Para el diseño de los oligonucleótidos se alinearon las secuencias de aminoácidos de p38 de *M. sexta*, con las de otras especies de insectos. Sin embargo, los esfuerzos en este sentido, que incluyeron distintas condiciones de amplificación y distintos iniciadores para sintetizar el cDNA (oligo-dT, iniciadores al azar y oligonucleótido forward de p38), fueron infructuosos. Posteriormente, el Dr. Yannick Pauchet (Universidad de Exeter, Reino Unido), publicó una colección de EST (Expressed Sequence Tags) obtenida de intestinos de *M. sexta*. Mediante un análisis *in silico* usando como sonda la secuencia de p38 de *B. mori* (NM\_001043585.1) contra la base de datos de IceBLAST (proporcionada por el Dr. Pauchet, Exeter University) (<http://rfc.ex.ac.uk/iceblast/iceblast.php>), se obtuvieron secuencias correspondientes a 2 ensamblajes (“contigs”) armados con varios ESTs. Con estas secuencias se diseñaron los oligonucleótidos contra p38 de *M. sexta* (Tabla 3 M.M.). El gen p38 en *M. sexta* se expresa a un nivel basal bajo. Debido a que el banco de cDNA analizado proviene de larvas no expuestas a toxinas o xenobióticos, la estrategia para aislar el gen consistió en tratar de inducir la expresión de p38, mediante la exposición de orugas de segundo instar de *M. sexta* a diferentes concentraciones de la toxina Cry1Ab (1, 2 y 4 ng/cm<sup>2</sup>) durante 7 días. Con este material, se logró amplificar por RT-PCR un fragmento de aproximadamente 200 pb (Figura 1 R.), cuya secuencia posee homología del 90% con los genes de p38 de *Ae. aegypti* y *B. mori*. La secuencia del cDNA del fragmento del gen p38 de *M. sexta* que aislamos, actualmente está depositada en el Gen Bank con el número de acceso: GU045524.

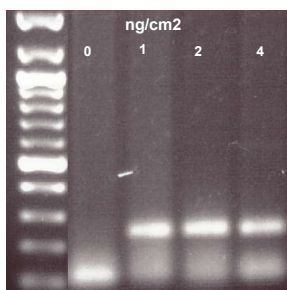


Figura 1 R. Inducción del transcrito de p38 en *M. sexta* por Cry1Ab. RT-PCR del gen p38 sobre RNA de intestinos de *M. sexta*. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Intestino de *M. sexta* no expuestas a la toxina. Carriles 3, 4 y 5: Intestinos de *M. sexta* tratadas con 1ng/cm<sup>2</sup>, 2ng/cm<sup>2</sup> y 4ng/cm<sup>2</sup> de Cry1Ab.

#### **4) Análisis de la expresión de p38.**

**4A) Expresión del mensajero de p38 en células del intestino de larvas de *Ae. aegypti* intoxicadas con CL<sub>50</sub> Cry11Aa a distintos tiempos.** Los niveles de transcrito de p38 en *Ae. aegypti* fueron examinados a partir de larvas expuestas a la CL<sub>50</sub> de la toxina Cry11Aa a diferentes tiempos. La cinética del efecto de la CL<sub>50</sub> de Cry11Aa sobre el RNAm de p38 en células intestinales de *Ae. aegypti*, fue analizada mediante la densitometría de las imágenes de los geles de agarosa de las muestras obtenidas en el del RT-PCR. Así se detectó una inducción de p38 de 1.65 veces a 1 h de exposición, 1.8 veces a las 2 h; 1.33 a las 16 h y 1.53 a las 24 h. (Figura 2 R.).

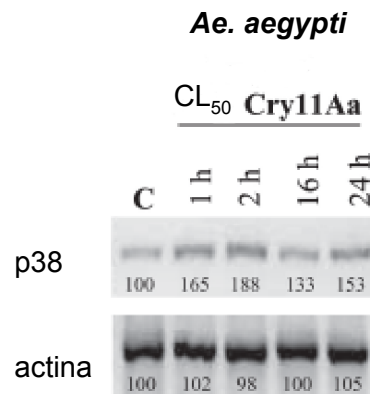


Figura 2 R. Inducción del mensajero de p38 en *Ae. aegypti* provocada por la exposición a Cry11Aa. El intestino de larvas de cuarto instar fue disectado en distintos tiempos; a partir de estas muestras se amplificó el fragmento de p38 y el fragmento de actina como control constitutivo. Los números debajo de las bandas indican los porcentajes del análisis densitométrico, donde la muestra sin toxina es el 100% de la expresión de ambos genes .

**4B) Expresión del mensajero de p38 en células del intestino de larvas de *M. sexta* intoxicadas con CL<sub>50</sub> Cry1Ab a distintos tiempos.** La cinética de expresión del mensajero de p38 en células de intestino retados con la CL<sub>50</sub> de Cry1Ab mostró una inducción de p38, que claramente contrasta con la expresión de esta proteína en ausencia de la toxina (Figura 3 R.). Los niveles de expresión del mensajero en todas las muestras se analizaron mediante densitometría de las respectivas imágenes de los geles de agarosa. En la figura 3 R. se muestra que la CL<sub>50</sub> de Cry1Ab provoca una inducción gradual de p38 a través del tiempo en el intestino de *M. sexta*, alcanzándose la máxima expresión de este gene a los 7 días de tratamiento. Los datos encontrados por este método fueron: 1 día de exposición a la toxina indujo 2.08 al RNAm de p38, a los 2 días se indujo 2.76 y a los 7 días 3.89 (Figura 3R.). Estas muestras también fueron analizadas por PCR en tiempo real (Quantitative PCR).

El ensayo de tiempo real (realizado por cuadruplicado) muestra que las células del intestino de la larva de *M. sexta* tratadas con la Cry1Ab CL<sub>50</sub>, a las 24, 48 h y 7 días incrementan los niveles de RNAm en 1.83, 3.08 y 7.42 veces, respectivamente (Figura 4 R.). Estos resultados mostraron la misma tendencia que los obtenidos por RT-PCR semicuantitativo.

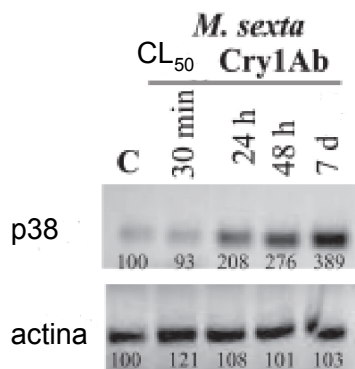


Figura 3 R. Inducción del mensajero de p38 en *M. sexta* provocada por la exposición a Cry1Ab. El intestino de larvas de tercer instar fue disectado en distintos tiempos; a partir de estas muestras se amplificó el fragmento de p38 y el fragmento de actina como control constitutivo. Los números debajo de las bandas indican los porcentajes del análisis densitométrico, donde la muestra sin toxina es el 100% de la expresión de ambos genes .

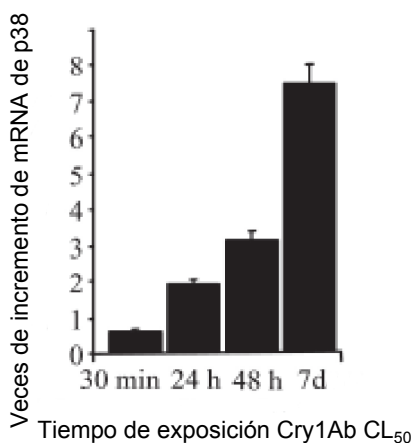


Figura 4 R. PCR cuantitativo del mensajero de p38 en *M. sexta* retada con la CL<sub>50</sub> Cry1Ab. El número de veces de incremento del mensajero a través del tiempo inicia a partir de las 24h, llegando a su máximo a los 7 días.

4C) Expresión de la proteína p38 en células del intestino de larvas de *Ae. aegypti* expuestas a la CL<sub>50</sub> Cry11Aa a diferentes tiempos. La búsqueda en la base de datos de Vectorbase.org permitió determinar el peso teórico de los miembros de la ruta de p38 en insectos (Tabla 2 R.)

Tabla 2 R. Pesos moleculares predichos para proteínas de la ruta de p38 de diferentes insectos.

	p38 PM	Sek PM
<i>Ae. aegypti</i>	40 kDa	38 kDa
<i>M. sexta</i>	41 kDa	----
<i>A. gambiae</i>	40 kDa	41 kDa

Las larvas de *Ae. aegypti* tratadas con la toxina Cry11Aa CL<sub>50</sub> por 24 h mostraron una inducción de 124% de la proteína con respecto a las larvas sin tratamiento (Figura 5R), mientras que en las larvas tratadas con Cry11Aa CL<sub>95</sub> se observó una reducción en la expresión de p38 (63% con respecto al control), y esto probablemente se debió a que estas concentraciones de toxina induce la muerte de las larvas de *A. aegypti* y por ende la degradación de la proteína p38 (Figura 5R.). Mediante ensayos tipo Western blot se detectó a p38 en muestras disectadas a tiempos tempranos de exposición (0.5 y 1 h) con la toxina Cry11Aa, se encontró que la expresión de la proteína p38 a estos tiempos no varió con respecto al control (Figura 7 R.).

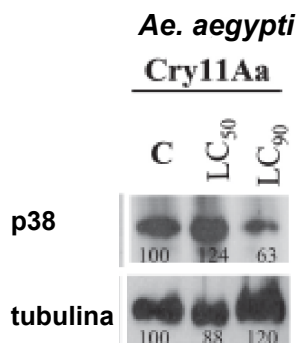


Figura 5 R. Inducción de la proteína p38 en *Ae. aegypti* provocada por la CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> de Cry11Aa. Los intestinos de larvas de cuarto instar se disectaron a las 24 h después de la exposición a distintas concentraciones letales de toxina. Los números debajo de las bandas indican los porcentajes del análisis densitométrico, donde la muestra sin toxina es el 100% de la expresión de las proteínas p38 y tubulina.

4D) Expresión de la proteína p38 en células del intestino de larvas de *M. sexta* incubadas a la CL<sub>50</sub> Cry1Ab a diferentes tiempos. La inmunodetección de p38 en proteínas totales aisladas de larvas de *M. sexta* expuestas durante 7 días a la CL<sub>50</sub> de Cry1Ab, mostraron un incremento del 650% en la abundancia de la proteína p38. Las larvas expuestas a la CL<sub>95</sub> de Cry1Ab presentaron una inducción del 300% con respecto al control, lo cual representa menos de la mitad de la abundancia detectada con la CL<sub>50</sub> (Figura 6 R.). La abundancia de p38 en intestinos de larvas tratados durante 0.5 y 1 h con CL<sub>50</sub> de Cry1Ab no varió con respecto al control (Figura 8 R.).

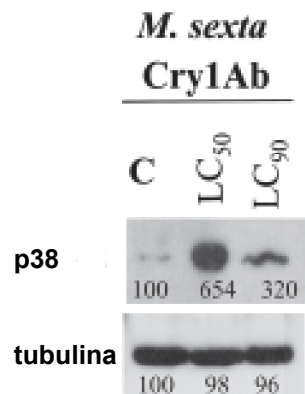


Figura 6 R. Inducción de la proteína p38 en *M. sexta* provocada por la exposición a Cry1Ab. El intestino de larvas de tercer instar fue disectado a los 7 días después de la exposición a distintas concentraciones letales de toxina; los números debajo de las bandas indican los porcentajes del análisis densitométrico. Los números debajo de las bandas indican los porcentajes del análisis densitométrico, donde la muestra sin toxina (C) es el 100% de la expresión de las proteínas p38 y tubulina.

### **5) Análisis de la activación de p38 por fosforilación.**

**5A) Fosforilación de p38 en células del intestino de larvas de *Ae. Aegypti* en respuesta a la CL<sub>50</sub> de Cry11Aa a tiempos cortos.** Encontramos que el reto con Cry11Aa CL<sub>50</sub> incrementa la fosforilación de p38 1108% a los 30 min y 3220% a 1 h de exposición. Un tratamiento análogo con la concentración equimolar de la mutante no tóxica Cry11Aa-R90E no activó la fosforilación de esta proteína en las muestras tratadas durante los mismos lapsos de tiempo (Figura 7 R.).

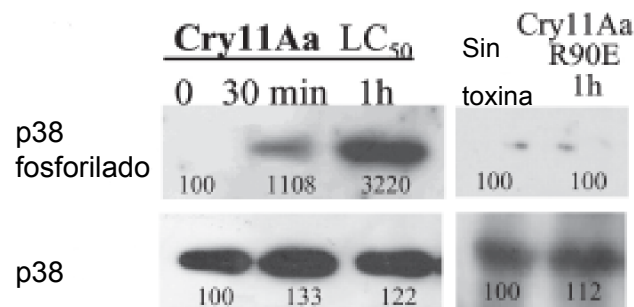


Figura 7 R. Fosforilación de la proteína p38 en *Ae. aegypti* en respuesta a la exposición a la CL<sub>50</sub> de Cry11Aa. El intestino de larvas de cuarto instar fue disectado a tiempos cortos (30 min y 1 h) de intoxicación. La mutante en oligomerización Cry11AaR90E no generó fosforilación de la proteína p38; los números debajo de las bandas indican los porcentajes del análisis densitométrico, donde la muestra sin toxina (C) es el 100% de la expresión de las proteínas p38 en su versión fosforilada y p38 sin fosforilar.

**5B) Fosforilación de la proteína vs tiempo de exposición a la CL<sub>50</sub> de Cry1Ab en células del intestino de larvas de *M. sexta*.** Con el objetivo de conocer si la proteína p38 de células intestinales de *M. sexta* se fosforila *in vivo* por la intoxicación por Cry, se analizó la fosforilación de larvas de segundo instar *M. sexta* previamente expuestas a la toxina Cry1Ab a tiempos cortos. Se encontró que la CL<sub>50</sub> Cry1Ab incrementó los niveles de fosforilación en un 394 y 608% a los 30 min y 1 h de exposición, respectivamente. Las

larvas tratadas por una 1 hora con exceso de toxina ( $20 \text{ ng/cm}^2$ ) presentan un incremento aun mayor (2700%) en los niveles de fosforilación de p38.

Se probó una toxina mutante que no presenta actividad de oligomerización,, la toxina Cry1Ab-R99E que en la concentración equivalente a la Cry1Ab  $CL_{50}$  no fosforila a p38 en las células blanco después de una hora de exposición (Figura 8 R.).

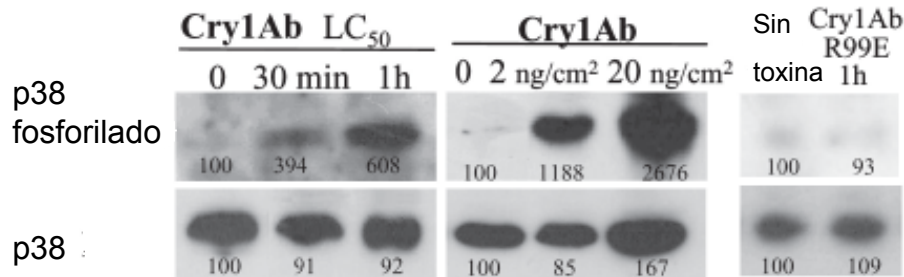


Figura 8 R. Fosforilación de la proteína p38 en *M. sexta* en respuesta a la exposición a la  $CL_{50}$  de Cry1Ab. Los intestinos de larvas de tercer instar fueron disectados a tiempos cortos (30 min y 1 h) de intoxicación. Adicionalmente se usó una exceso de toxina ( $20 \text{ ng/cm}^2$ ) lo cual fosforiló dramáticamente a la proteína p38. Se usó a la mutante en oligomerización Cry1AbR99E la cual no generó fosforilación; los números debajo de las bandas indican los porcentajes del análisis densitométrico. Los números debajo de las bandas indican los porcentajes del análisis densitométrico, donde la muestra sin toxina (C) es el 100% de la expresión de las proteínas p38 en su versión fosforilada y p38 sin fosforilar.

## **6) Análisis funcional de la ruta de p38 en la intoxicación con Cry.**

**6A) en la línea celular 4A3A de *A. gambiae*.** La disponibilidad de una línea celular de mosquito contribuyó a la obtención de información aplicable a los modelos *in vivo*, la estandarización de estrategias experimentales que facilitaron la obtención de resultados y permitió aproximaciones en el conocimiento del funcionamiento del sistema de respuesta a Cry en insectos. Para explorar la función de la ruta de p38 en insectos, se usó al inhibidor específico de mamíferos (SB203580; Sigma-Aldrich,) de dicha proteína. Como control, las células fueron expuestas a la concentración de DMSO que se utiliza para disolver a SB203580, el cual puede ser tóxico para las células; disminuye la  $CL_{50}$ . Las diferencias en mortalidad entre los tratamientos y el control fueron significativas a partir de una concentración 40 nM, pero a 100 nM de toxina, las células tratadas con el inhibidor mostraron ser doblemente sensibles a la toxina. Para las células tratadas con el inhibidor de p38, la Cry11Aa  $CL_{50} = 50 \text{ nM}$ , mientras que la  $CL_{50}$  de las células tratadas con DMSO fue de 100 nM. Sin embargo, dado que el inhibidor usado no es específico para insectos, y para corroborar que la participación de p38 es fundamental durante la intoxicación por toxinas Cry se decidió utilizar la tecnología de RNA interferencia para silenciar p38.

Inicialmente, las estrategias de silenciamiento en la línea celular 4A3A se basaron en información publicada sobre la incorporación espontánea del dsRNA a las células (Hoa, 2003), según la cual es suficiente la adición al medio de  $6 \mu\text{g}$  de dsRNA específico/ $10^6$  células/mL. Así mismo, debido a que inicialmente el rendimiento de la síntesis de dsRNA no estaba optimizado ( $0.05 \mu\text{g}/1 \mu\text{L}$ ), se inició con la adición de dsRNA desnudo a una concentración de  $0.5 \mu\text{g}/5 \text{ mL}$  de medio. Sin embargo, una vez optimizado el método probamos concentraciones hasta de  $24 \mu\text{g}/2.5 \text{ mL}$  de medio (desde 8 hasta 48 h). Los resultados de silenciamiento fueron negativos, ya que mediante ensayos de tipo Western



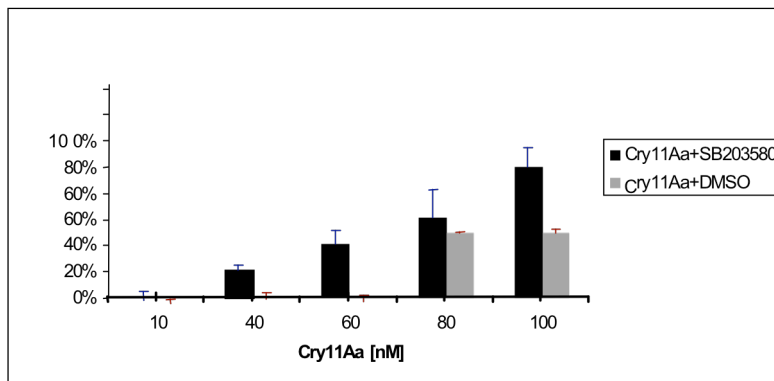


Figura 9 R. Papel de p38 en la sensibilidad de la línea celular 4A3A hacia la toxina Cry11Aa. El pretratamiento con inhibidor de p38 hace mas sensible a la línea celular 4A3A ante el reto con Cry11Aa. El porcentaje de mortalidad ( eje de las Y) fue mayor en las células inhibidas en p38 que en las células control cuando ambas poblaciones fueron expuestas a distintas concentraciones de la toxina específica.

blot no se detectó ninguna disminución de la proteína cinasa cinasa de la ruta de p38 (Sek) entre el control y el tratamiento con dsRNA. Con la idea de que el problema radicaba en el transporte deficiente de ácidos nucleicos al interior celular, se decidió probar como reportero a la proteína verde fluorescente (PVF; Figura 10 R.). La comparación entre 2 cultivos de un millón de células en 0.5 mL de medio adicionados con 1  $\mu$ g de DNA plasmídico con la PVF, desnudo o encapsulado en Effectene (Qiagen), permitió ver que después de 72 h el cultivo expuesto al ácido nucleico cubierto con Effectene presentó expresión de la PVF, mientras que en las células que fueron expuestas a la misma cantidad de DNA desnudo (sin empaquetar previamente en Effectene) no mostraron expresión de la proteína reportera (Figura 10 R.).

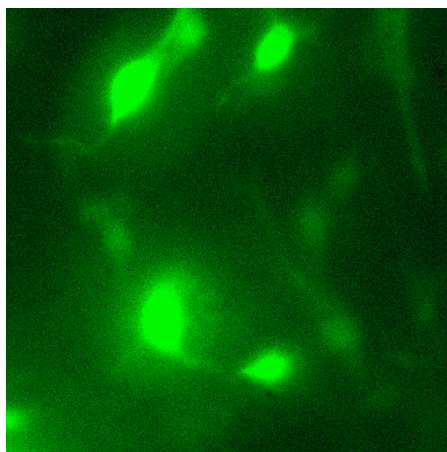


Figura 10 R. Células 4A3A de *A. gambiae* transfectadas con la PVF. La transfección facilitada por el vehículo Effectene, demostró que el ácido nucleico de interés se incorporaba al interior celular mediante los liposomas comerciales Effectene.

Aunque la eficiencia de transformación no alcanzó el 50%, resultó evidente que el Effectene funciona adecuadamente como un vehículo de transporte de ácidos nucleicos al interior de las células de insecto. Para hacer más eficiente la transformación se modificaron algunas condiciones recomendadas por el fabricante, estableciéndose una proporción de 1:25 (ácido nucleico:Effectene), como la más eficiente para dirigir la expresión y el silenciamiento de genes, tanto en la línea celular 4A3A de *A. gambiae*, como en larvas de *Ae. aegypti*. Se procedió entonces a sintetizar el dsRNA de *sek*, el cual fue encapsulado en Effectene previamente a la exposición a células de *A. gambiae*. La identificación específica de la proteína Sek mediante Western blot en extractos totales de la línea celular 4A3A de *A. gambiae*, se llevó a cabo con la finalidad de detectar diferencias en la cantidad de la proteína entre células control (transfectadas con Effectene vacío) y células expuestas a dsRNA de *sek* contenido en liposomas (Effectene). La inmunodetección de Sek en estas condiciones mostró una dramática disminución en la expresión de la proteína Sek en las células tratadas con dsRNA (Figura 11 R.).

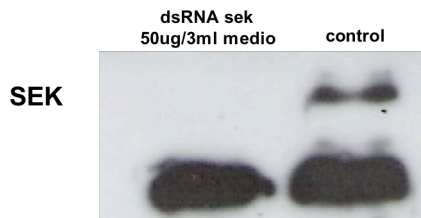


Figura 11 R. Inmunodetección de la proteína Sek en la línea celular 4A3A de *A. gambiae* entre un cultivo tratado con dsRNA de Sek y el control. La banda inferior corresponde a una proteína inespecífica asumida como control.

6B) en larvas de *M. sexta*. Un reporte previo a este trabajo mostró que *M. sexta* fue silenciada por microinyección con el dsRNA específico del receptor caderina (Soberón *et al.*, 2007). Posteriormente, se reportó que la administración vía oral del dsRNA es efectiva en coleópteros y lepidópteros (Mao *et al.*, 2007; Baum *et al.*, 2007)

En nuestros ensayos el dsRNA se administró a una concentración de 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante dos días consecutivos para alcanzar un consumo total de 1  $\mu\text{g}$  por larva; fue administrado vía oral a larvas neonatas de *M. sexta* en ayuno previo. Este método no fue exitoso ya que en estas condiciones las larvas alcanzaron porcentajes de mortalidad del 80% a los pocos días de ser tratadas. El 20% de sobrevivientes fue alimentado con dieta artificial hasta alcanzar el tercer instar en el que p38 fue monitoreada por inmunodetección, no observándose diferencias entre el control y el tratamiento. Los ensayos de silenciamiento fueron repetidos probando concentraciones de dsRNA de 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  administradas en unidosis a larvas neonatas, al término de la ingestión de la gota (1  $\mu\text{L}$ ) las larvas fueron alimentadas con dieta artificial hasta alcanzar el tercer instar. En estas condiciones, en las que aproximadamente el 85% de la población de larvas logro sobrevivir, se realizaron ensayos Western blot contra p38, sobre extractos totales de proteínas intestinales. Los organismos dosificados con 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de dsRNA presentaron una disminución parcial de p38, mientras que los individuos que ingirieron

5µg/µL de dsRNA de p38 no mostraron cantidades detectables de p38 en la inmunodetección (Figura 12 R.).

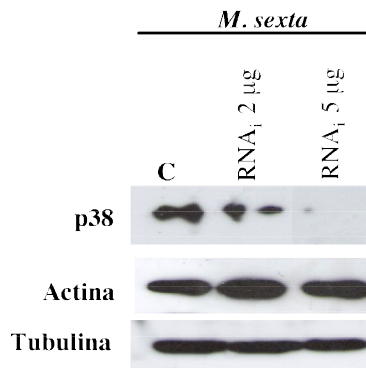


Figura 12 R. Inmunodetección de p38 en individuos de *M. sexta* tratados con diferentes cantidades de dsRNA de p38. El silenciamiento efectivo de p38 fue dependiente de la concentración del dsRNA específico.

Estos experimentos muestran, que bajo estas condiciones, el silenciamiento de la proteína p38 mediante alimentación de dsRNA es efectivo y dosis dependiente. Adicionalmente, los efectos de la ingestión de los 5µg/µL de dsRNA específico para p38, se corroboraron mediante RT-PCR sobre mismo material biológico (Figura 13 R.). Bajo nuestra estrategia experimental de análisis individual de las larvas, se logró un 80% silenciamiento a nivel de población. Como controles se analizaron la expresión del mensajero de actina y la expresión de tubulina a nivel de proteína. Ambos controles permanecieron sin cambios en expresión en las muestras de larvas con o sin tratamiento con dsRNA de MAPK/p38. Una vez corroborado el silenciamiento de p38 a nivel molecular procedieron los bioensayos de larvas silenciadas.

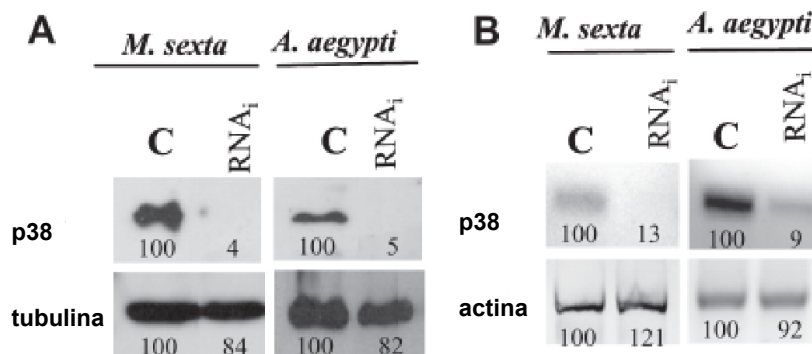


Figura 13 R. Silenciamiento de p38 en larvas *M. sexta* y *Ae. aegypti*. A) Ensayos de inmunodetección de p38 en muestras de *M. sexta* y *Ae. aegypti* tratados con dsRNA de p38. B) RT-PCR correspondientes a muestras de *M. sexta* y *Ae. aegypti* bajo tratamiento con dsRNA específico.

El bioensayo con larvas de *M. sexta* silenciadas en p38 y de larvas silvestres mostró que las larvas silenciadas en p38 al ser retadas con la toxina Cry1Ab muestran hipersensibilidad. La Cry1Ab  $CL_{50}$  calculadas por el programa Probit para las larvas silenciadas fue de 0.25 ng/cm<sup>2</sup> 0.15-0.4 vs la Cry1Ab  $CL_{50}$  para larvas silvestres fue de 2 ng/cm<sup>2</sup> 0.8-4. Las células intestinales de *M. sexta* desprovistas de p38 son 8 veces más sensibles a la toxina Cry1Ab que las larvas silvestres (Figura 14 R.).

### Toxicidad de Cry1Ab en *M. sexta*

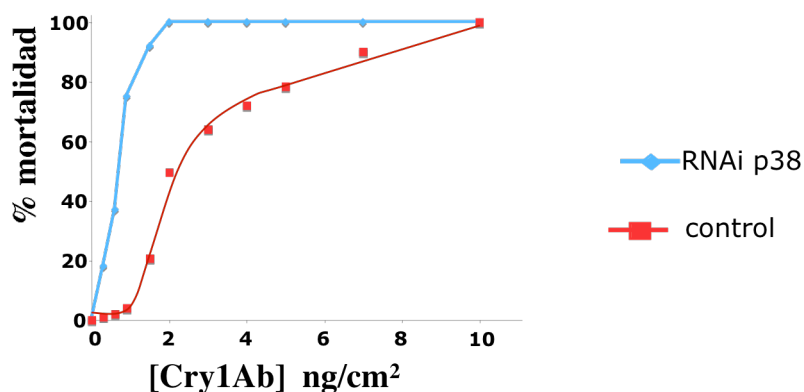


Figura 14 R. Gráfica de la mortalidad causada por Cry1Ab en larvas de *M. sexta* silenciadas en p38 y en larvas control.

6C) de larvas de *Ae. aegypti*. El silenciamiento del gen p38 en larvas de *Ae. aegypti* requirió de que diferentes condiciones experimentales fuera probadas (el resultado de este análisis se muestra en el ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS Tabla 3 R.). Debido al éxito obtenido con el silenciamiento de la línea celular de mosquito usando Effectene, se alimentaron larvas neo-natas con el p38-dsRNA encapsulando en liposomas de Effectene; en este caso, 10 larvas se mantuvieron durante 16 h en 10 mL de una solución conteniendo 10 µg de dsRNA incluido en liposomas, posteriormente, las larvas fueron transferidas a 100 mL de agua para recibir dieta regular hasta llegar al cuarto instar (aproximadamente 7 días). Debido a su tamaño, la muestra mínima sujeta a análisis consistió en 10 intestinos de larva. La inmunodetección de estas muestras biológicas mostró una disminución en la cantidad de p38 en organismos alimentados con el dsRNA. Adicionalmente, el silenciamiento se confirmó por RT-PCR, los niveles de los controles actina (mensajero) y tubulina (proteína) permanecieron sin alteración (Figura 13 R.).

En conclusión, el sistema para silenciar genes vía oral en larvas de *Ae. aegypti* implementado en este trabajo demostró ser efectivo y eficiente.

Las larvas silenciadas en p38 y las larvas control (expuestas a Effectene sin dsRNA) se sometieron a distintas concentraciones de la toxina Cry11Aa. Se encontró que la  $CL_{50}$  de las larvas control expuestas a Effectene fue menor con respecto al reportado en las

larvas silvestres (134 ng/mL). La  $CL_{50}$  = 3 ng/mL 2.8-4.1 en las larvas silenciadas en p38, mientras que la  $CL_{50}$  de su control = 30 ng/ml 25.2-36. Lo anterior mostró que la población de *Ae. aegypti* silenciada en p38 es 10 veces mas sensible a la toxina Cry11Aa que la población control (Figura 15 R.).

### Toxicidad de Cry11Aa en *Ae. aegypti*

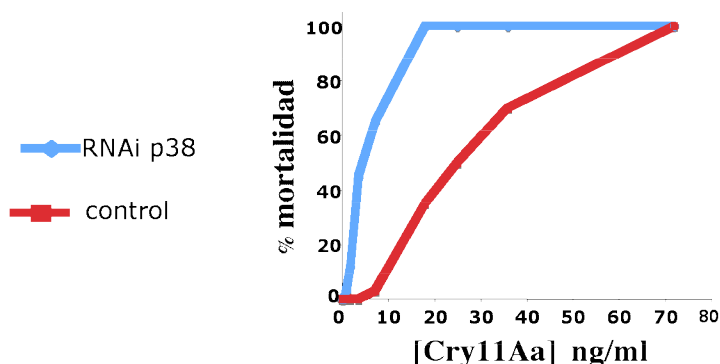


Figura 15 R. Gráfica de la mortalidad causada por Cry11Aa en larvas de *Ae. aegypti* silenciadas en p38 y en larvas control.

### **7) Análisis proteómico de larvas de *Ae. aegypti* intoxicadas con Cry11Aa.**

La técnica de electroforesis bidimensional requirió, como muchas de las técnicas usadas en este trabajo, ser adecuada para la separación de proteínas totales obtenidas de intestinos de larvas de *Ae. aegypti*. Los puntos a optimizar fueron los siguientes: obtención de material biológico en cantidad y calidad para ser separado en geles de 24 x 20 cm (500  $\mu$ g/gel); lisis de la muestra en condiciones ideales para la preservación de las proteínas, así como alto rendimiento; conservación y manipulación del material biológico en condiciones de baja degradación y altos niveles de pureza de la muestra. Para implementar la metodología más adecuada se realizaron varios ensayos preliminares comparando distintas técnicas.

a) Lisado celular. La muestra de interés se lisó tanto en el buffer de solubilización O'Farrell's (1975) compuesto de 9.5 M urea, 2% Igepal CA-630, 5% (v/v) 2-mercaptoetanol y 5% v/v anfolitos, como en el buffer sugerido por Amersham G.E. Healthcare Life Sciences, compuesto de Urea (FW 60.06) 7 M, Thiourea (FW 76.12) 2 M, CHAPS1 4% (w/v), anfolito (Farmalito o IPG Buffer) 0.5% (v/v), DTT (FW 154.2) 40 mM., resultando este último mucho más eficiente para la obtención de las proteínas intestinales de larva de *Ae. aegypti*.

b) Extracción de proteínas a partir del lisado. Se comparó el método de precipitación con acetona fría (Encarnación *et al.*, 2005), contra el del sistema "2-D Clean-Up Kit" de Amersham G.E. Healthcare, siendo este último el que hizo factible obtener mejores resultados.

c) Separación proteínas por carga eléctrica (punto isoelectrico o pI). Se realizaron pruebas entre el uso de tiras para separación de pI polimerizadas en el laboratorio (Encarnación *et al.*, 2005) y tiras comerciales elaboradas por Amersham GE Life Sciences. Así mismo, se examinaron la longitud de las tiras (7, 11, 13, 18 y 24 cm) y los rangos de pH (3-10 y 4-7). En este sentido, las tiras comerciales en un rango de pH de 3 a 10 separaron con mucha más eficiencia las proteínas de las muestra. Para los ensayos de prueba y estandarización se utilizaron tiras de 7 cm, mientras que para los ensayos de DIGE se eligieron las de 24 cm, debido a que la separación máxima de proteínas se consiguió con este tamaño de tira.

d) Separación de proteínas por masa molecular (electroforesis bidimensional). En este caso se probaron distintos gradientes y distintas dimensiones de geles. Los porcentajes de acrilamida en los geles fueron de 12 ó 15% o de gradientes (4-12%). Finalmente se optó por el uso geles de 24 cm al 12% de acrilamida. Las condiciones optimizadas permitieron una resolución adecuada tal como se muestra en la figura 16 R.

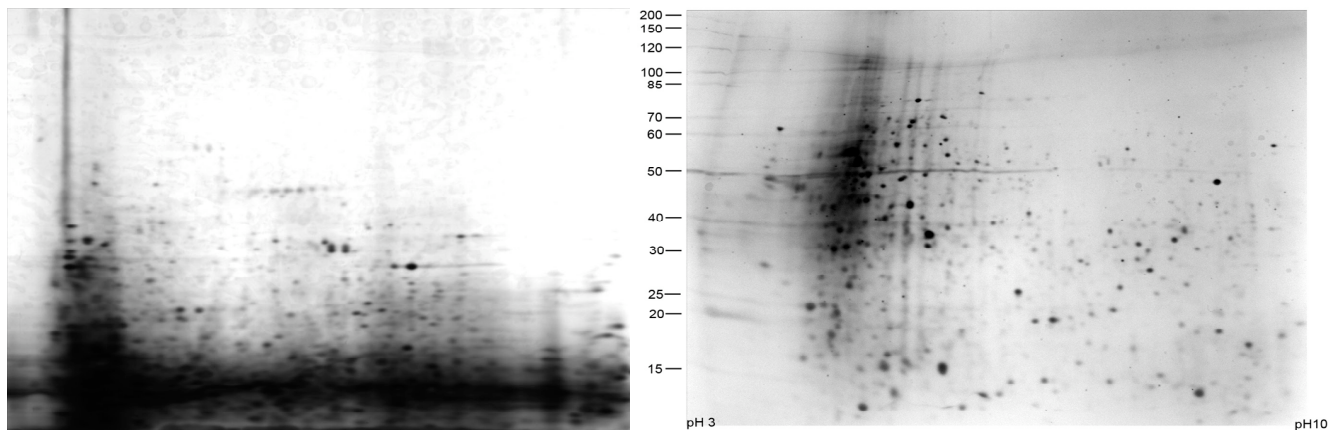


Figura 16 R. Adecuación de la técnica de 2D para *A. aegypti*. Estandarización de las condiciones de electroforesis bidimensional para las muestras intestinales de larva de *Ae. aegypti*. La imagen del lado izquierdo muestra los resultados de las condiciones de trabajo iniciales. El gel del lado derecho muestra el resultado de las adecuaciones realizadas. Comparación hecha usando tinción de plata, strips 18 cm 3 a 10 pH, 150  $\mu$ g proteína total.

e) Tinción de las proteínas en gel. La tinción por Coomassie coloidal (Biorad, México; Figura 17 R.) tiene un máximo de detección de 50 ng/punto, la tinción de plata permite detectar puntos de hasta de 1 ng (Figura 16 R; Lin *et al.*, 2008), ambas técnicas fueron usadas con fines de estandarización y obtención de datos preliminares. Finalmente se eligió el premarcaje de proteínas por CyDyes (GE, Life Sciences; Figura 18 R.) debido a su sensibilidad de detección de proteínas (su límite de detección por punto es de 500 pg) y elevado nivel de confianza de este ensayo. Para cortar los puntos del gel con el “spot picker”, los puntos se visualizaron mediante las tinciones fluorescentes de “Deep purple” (Amersham GE, Life Sciences) y “Sypro Ruby” (Amersham GE, Life Sciences). El ensayo DIGE en el que se hizo la comparación entre proteomas intestinales intoxicados con Cry11Aa CL<sub>10</sub> e intoxicados con Cry1Ab arrojó varias proteínas diferenciales, las

candidatas fueron analizadas por la técnica de Finger printing (comparación de patrones de secuencia). Sin embargo sólo 2 proteínas emparejaron con la base de datos con la

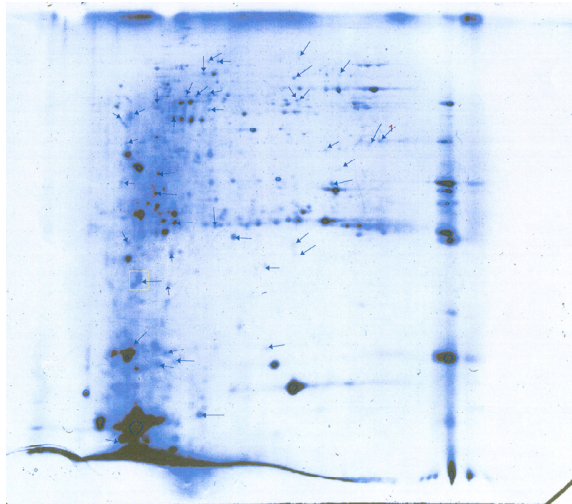


Figura 17 R. Candidatos preliminares del proteoma diferencial del intestino de *A. aegypti* tratados con toxina específica. Mediante la comparación entre geles teñidos con azul Coomasi se realizó un análisis preliminar hecho con el software MELANY para encontrar proteínas diferenciales propias de la condición reto con Cry11Aa. Las flechas muestran proteínas diferenciales arrojadas por dicho análisis.

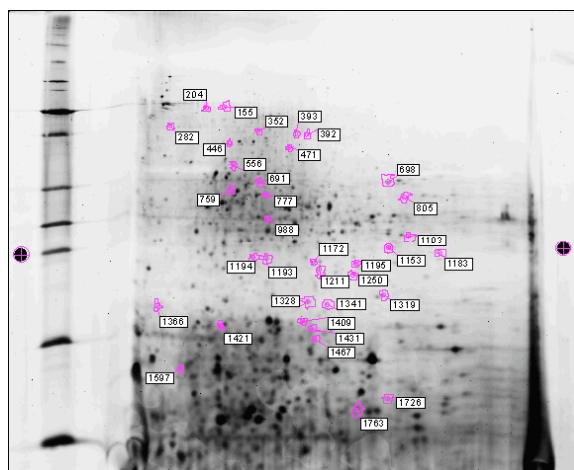


Figura 18 R. Imagen del Picking Gel con los spots candidatos resultante del análisis DIGE. Después de la comparación hecha con el software DeCyder (Amersham) entre las imágenes fluorescentes de los geles 2D se encontraron varias proteínas con expresión diferencial. La extracción de las manchas proteicas se realizó mediante el picado del área precisa.

suficiente fiabilidad. Considerando un score de proteína mayor a 74 como significativo ( $p < 0.05$ ), se validó la identificación de: la subunidad beta de la subunidad de la ATP sintasa tipo F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> (gi 94468834) y una endopeptidasa tipo serina (gi 157118174) ambas anotados en el genoma de *Aedes aegypti* y cuyos respectivos scores fueron 92 y 104. La subunidad de la ATP sintasa tipo F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> se indujo 1.23 veces, y endopeptidasa tipo serina -1.38 veces. Recientemente en la literatura, encontramos reportes, que señalan a ambas

entidades como proteínas involucradas en respuesta celular a estrés (Zhao *et al.* 2009; Chunju *et al.* 2010; Arora *et al.* 2009). Para incrementar el acervo de proteínas de mosquito destacadas por su participación de respuesta a Cry11Aa se decidió repetir este análisis bajo distintas condiciones de intoxicación de las larvas.

Para un nuevo análisis DIGE se modificaron las condiciones de exposición de las larvas a la toxina. La estrategia se fundamenta en la idea de que un estímulo tóxico de mayor concentración puede impactar de manera más contundente el perfil de proteínas. Bajo ese racional, se hizo un escrutinio de tiempos de exposición a la toxina Cry11Aa CL<sub>50</sub> menores a un día, tratando de ubicar el mejor momento para la disección de intestinos con las siguientes características: a) Que la movilidad de las larvas intoxicadas fuera equivalente a la de las larvas no tratadas, b) Que la integridad intestinal al momento de la disección fuera similar la de las larvas no expuestas a la toxina y c) Que el perfil proteico en un gel 2-D no mostraran degradación de proteínas.

Se eligió el tiempo 5 h para exponer las larvas a la CL<sub>50</sub> Cry11Aa antes de la disección intestinal. Se realizó el ensayo DIGE usando como controles al equivalente molar de Cry1Ab y sólo buffer; a partir de la comparación de estas muestras mediante el programa DeCyder (GE, Life Sciences) se encontraron 47 proteínas diferenciales (inducidas o reprimidas) propias de la condición CL<sub>50</sub> Cry11Aa. Algunas de proteínas analizadas se muestran en la figura 19 R.

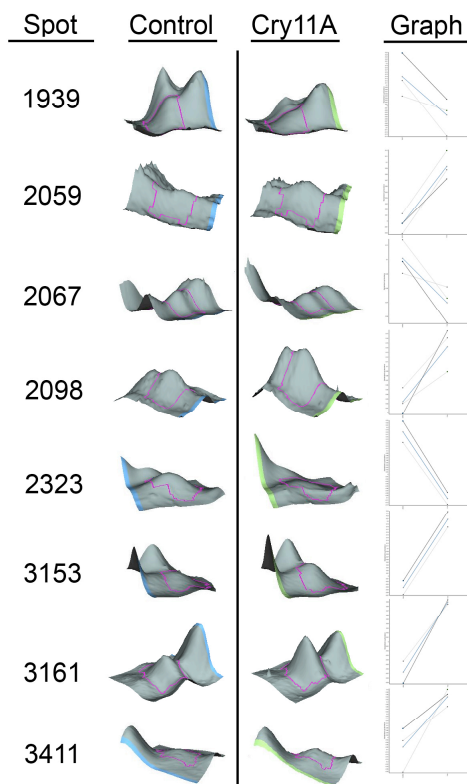


Figura 19 R. Gráficos del análisis tipo DIGE. Imágenes 3D de la intensidad de la fluorescencia de los spots correspondientes a la misma proteína bajo distintos tratamientos (control vs Cry11Aa). Las líneas independientes de cada gráfica corresponden a 4 muestras biológicas independientes, cada línea conecta las abundancias log del spot encontrado en el control (izquierda) y la del spot encontrado en el tratamiento Cry11Aa (derecha).



## DISCUSIÓN

En la literatura existen numerosos trabajos que reportan respuestas intracelulares de distintas células blanco hacia diversas TFP (Atapattu y Czuprynski 2005; Bischof *et al.*, 2008; Deretic *et al.*, 2006; Fink y Cookson, 2005; Gonzalez *et al.*, 2008; Gurcel *et al.*, 2006; Gutierrez *et al.*, 2007; Huffman *et al.*, 2004; Husmann *et al.*, 2006; Husmann *et al.*, 2009; Idone *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2002; McNeil y Kirchhause 2005; Sifri *et al.*, 2003; Stringaris *et al.*, 2002; Stassen *et al.*, 2003; Thelestam y Møllby, 1983; Valeva, 2000; Wiles *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2006). El efecto que genera determinada toxina formadora de poro en la célula diana puede ser variable. Una misma TFP puede causar diferente daño a la membrana plasmática del huésped (y por tanto distinta respuesta celular) y esto depende de la concentración de la toxina y el tiempo de exposición a la misma. Aunque las dos respuestas básicas que determinan el del destino celular del hospedero hacia las TFP son: la muerte por lisis osmótica o la sobrevivencia celular. Dentro de estas dos respuestas, existe una gama de mecanismos celulares que los organismos blanco han desarrollado para ya sea contender contra la acción de estas toxinas o sucumbir antes el ataque de las mismas. Dentro de estos mecanismos están aquellos que detectan daño al DNA, proteínas y lípidos, así como mecanismos de estabilización y reparación, los cuales determinan la activación de la muerte apoptótica, por oncosis, o piroptosis, o la activación de mecanismos de supervivencia, tales como: la respuesta UPR mediada por la ruta de la MAPK, p38; la activación de biosíntesis de lípidos; mecanismos de endocitosis o autofagia (Cancino-Rodezno *et al.*, 2009). Entre los trabajos que han contribuido en el conocimiento de las TFP y los mecanismos por los que las células blanco responden, destaca el realizado por Huffman y colaboradores (2004), puesto que además de haberse realizado con organismos completos de *C. elegans* (y no en líneas celulares como el resto de los trabajos publicados con anterioridad) fue el primero que empleó una toxina Cry como TFP disparadora de una respuesta intracelular. Mediante distintas técnicas, Huffman y colaboradores (2004) demostraron que la ruta de p38 MAPK está implicada en la defensa hacia la toxina Cry5 en *C. elegans*. Estos resultados sugirieron que esta misma ruta podría estar participando en la activación de mecanismos de defensa de los insectos hacia las toxinas Cry específicas.

Nuestra primera aproximación experimental para conocer la posible participación de p38 en la respuesta celular de insectos hacia las toxinas Cry se realizó en la línea celular 4A3A de *A. gambiae* usando un inhibidor comercial SB203580 de la proteína p38. El resultado de hipersensibilidad hacia la toxina Cry11Aa en células preincubadas con el inhibidor sugirió que p38 está implicada en la respuesta de defensa. El hecho de contar con la línea celular 4A3A permitió la obtención de resultados importantes para este trabajo, así como extrapolar la metodología e información para la realización de experimentos con insectos y no en líneas celulares.

El siguiente objetivo fue demostrar la participación de p38 en la respuesta de defensa ante Cry en organismos completos usando la técnica de silenciamiento. Para llevar a cabo dicho objetivo, se requirió la amplificación de los genes de la ruta de p38 en nuestros modelos de estudio, lo cual permitió clonar las secuencias específicas de los genes a silenciar, comparar la expresión del mensajero de p38 en poblaciones tratadas con dsRNA vs controles y monitorear el efecto de Cry (la inducción o la represión) en la expresión de mRNA de los genes de la ruta de p38 en nuestros modelos. Consideramos válida la clonación de un solo gen de la ruta de p38 por especie, debido a que esta vía actúa como cascada y la activación o inactivación de un solo miembro rinde información sobre el estado general de la ruta completa.

Los resultados obtenidos a partir de la exposición de células intestinales del mosquito *Ae. aegypti* y de la oruga *M. sexta* a toxinas Cry específicas mostraron que existe inducción de p38 a 3 niveles: transcripcional, traduccional y postraduccional. Se encontró que en *M. sexta* la inducción es dramática a nivel transcripcional (de 8 veces en muestras intoxicadas con la CL<sub>50</sub> Cry1Ab) y traduccional (de 6 veces las larvas tratadas con CL<sub>50</sub> Cry1Ab en comparación con el control). En contraste con las inducciones moderadas que presentaron las larvas de *Ae. aegypti* intoxicadas con CL<sub>50</sub> Cry11Aa; a nivel transcripcional la inducción fue del doble con respecto al control y del 1.2 veces a nivel de proteína. Ambos incrementos fueron los mayores que se registraron al retar a los mosquitos con distintas concentraciones de Cry11Aa según distintas cinéticas contra concentración y contra tiempo realizadas. Al mismo tiempo, se observó que los niveles basales de p38 en *M. sexta* tanto de RNAm como de proteína son casi imperceptibles, incluso la comunicación personal con el Dr. Pauchet (Exeter University, U.K.) respaldó

esta información: a nivel transcripcional, p38 tiene una expresión baja en intestinos de larva de *M. sexta*. Para lograr la amplificación de p38 fue necesario inducirlo su expresión por exposición a la toxina. La diferencia en expresión basal de p38 entre ambos insectos puede obedecer únicamente a la naturaleza de cada especie. Sin embargo, es posible que los niveles basales de mensajero y proteína de p38 en ambos insectos estén relacionados con el manejo que durante varias generaciones se les ha dado en el laboratorio, es decir, si p38 es un elemento de respuesta a estrés y los individuos de *M. sexta* y *Ae. aegypti* usados en este trabajo fueron crecidos en condiciones libres de estrés o de estrés respectivamente, esto puede explicar la diferencia en expresión basal de p38 entre ambas especies.

*M. sexta* como modelo de estudio en el laboratorio recibe cuidados exhaustivos desde la eclosión (dieta estéril, temperatura controlada, fotoperiodo y humedad controlada). Estos cuidados son un requisito para el desarrollo de la población de *M. sexta*, que además se considera endogámica, puesto que individuos de campo no son incorporados al pie de cría. En contraste, los mosquitos se mantienen en el laboratorio en condiciones mucho permisivas (eclosión y crianza en agua corriente, dieta no estéril y crecimiento a temperatura ambiente), además cada determinado tiempo se incorporan mosquitos capturados en campo para la reproducción de *Ae. aegypti*. Consideramos que la expresión diferencial de p38 en nuestro modelo de lepidópteros y de dípteros puede estar relacionado con su tipo de vida. En consecuencia la expresión basal baja de p38 en *M. sexta* se ve notablemente incrementada ante el estímulo de Cry; así como el nivel basal elevado de p38 en *Ae. aegypti* ante la inducción con Cry resulta moderado o incluso imperceptible, probablemente porque no la cantidad de p38 en “stock” es suficiente para responder al reto de la Cry específica.

La fosforilación de la cinasa de proteína p38 es el indicador de su activación. La forma activa de p38 en ambos insectos, posee una expresión basal mínima en ambas especies y la aplicación de la toxina específica CL<sub>50</sub> a tiempos cortos (desde 30 min hasta 1 h) fue suficiente para inducir fosforilación. Esta fosforilación “*de novo*” y a tiempos cortos con respecto al control, implica la existencia de un reservorio celular de p38 no activo, pero factible de fosforilación para responder de forma rápida. Así mismo cuando se realizó una cinética de fosforilación con la CL<sub>50</sub> de las toxinas Cry11Aa y Cry1Ab en mosquitos y

orugas a través del tiempo, encontramos la misma tendencia: picos y valles intermitentes en la intensidad de fosforilación, lo cual correlaciona con la naturaleza dinámica y transitoria de la fosforilación de proteínas. El mecanismo reversible de fosforilación protéica es esencial en la regulación de la actividad enzimática y la señalización intracelular, principalmente por dos razones: el estado de fosforilación de una proteína sustrato refleja su actividad y porque esta modificación postraducciona elicit múltiples efectos en la proteína sustrato de manera transitoria. La recurrencia del evento de fosforilación a través del tiempo se debe a que la disponibilidad de la toxina mantenida durante determinado tiempo sigue estimulando a las rutas de respuesta a estrés. Debido a lo cual encontramos los picos de p38 fosforilado incluso a los tiempos máximos del bioensayo (24 h en *Ae. aegypti* y 7 días en *M. sexta*). Sin embargo, la respuesta inicial de fosforilación de p38 es manifiesta desde 30 min de exposición a toxina Cry en ambos insectos.

Las proteínas obtenidas de bioensayos de *Ae. aegypti* y de *M. sexta* hechos con toxinas mutantes deficientes en oligomerización Cry11Aa-R90E y Cry1Ab-R99E respectivamente, revelaron a p38 no fosforilado, esto nos permitieron relacionar la incapacidad de oligomerizar con la ausencia de fosforilación de p38. La formación de poro ha sido relacionada con el desbalance electrolítico celular de Calcio y Potasio. Recientemente se han podido identificar componentes de rutas de señalización que participan en la respuesta hacia distintos estreses, entre ellos la ruta que sensa el exceso de sales (Salt-Overly-Sensitive-SOS), ésta es inducida por la señal de Calcio, detectada por la proteína de unión a calcio SOS3 que a su vez activa a la cinasa de proteína SOS2. El complejo SOS3±SOS2 regula la expresión del transportador de iones SOS1 que restablece la homeostasis iónica en la célula, varios miembros de las MAPK han sido descritos en la respuesta SOS así como en otras respuestas a estrés biótico y abiótico, por lo que resulta esperable que la proteína p38 en insectos se active para responder a la formación de poro como se demostró en el presente trabajo en los experimentos hechos con mutantes en la formación de la estructura de pre-poro.

Para poder concluir que la formación de poro es la responsable de disparar la activación de p38 en la célula blanco, se requiere de mutantes afectadas en formación de poro pero que si puedan oligomerizar, actualmente se está trabajando en el laboratorio en la

obtención de estas mutantes.

En nuestro laboratorio previamente se habían realizado ensayos de silenciamiento del receptor caderina en *M. sexta* por microinyección del dsRNA específico, éste método fue efectivo (Soberón *et al.*, 2007) sin embargo resultó muy invasivo para las larvas promoviendo una alta tasa de mortalidad por manejo. Posteriormente, otro grupo de investigación reportó que la administración vía oral del dsRNA es efectiva en coleópteros y lepidópteros (Mao *et al.*, 2007; Baum *et al.*, 2007), por tanto, en nuestro laboratorio se integró esta técnica para realizar ensayos de silenciamiento del gen caderina alimentando a *M. sexta*. Mediante inmunodetección en larvas de 3er instar se encontró que la caderina disminuye notablemente en expresión cuando en su estadio neonato les fue previamente administrando 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  del dsRNA específico (comunicación personal Dra. Isabel Gómez). Sin embargo el silenciamiento de un gen distinto, la aminopeptidasa, usando la misma técnica de silenciamiento, se requirió de administrar a cada larva 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de dsRNA (comunicación personal Vibiana Flores, estudiante de Doctorado). Lo que se interpretó como una posible relación eficiencia en silenciamiento/cantidad de dsRNA inicial; y que esta cantidad de dsRNA sea particular para cada gen. Para iniciar nuestros ensayos de silenciamiento de p38 alimentamos larvas neonatas con 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de dsRNA. El resultado de silenciamiento fue negativo, por lo que se optó por probar 2 nuevas concentraciones: 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , que además de servir para evaluar la cantidad de dsRNA necesario para silenciar p38 de *M. sexta*, el probar simultáneamente 2 concentraciones fue útil para conocer si el sistema de silenciamiento de este gen se comporta como un todo o nada o si es gradual. El resultado de la comparación de larvas que consumieron 2  $\mu\text{g}$  o 5 $\mu\text{g}$  vs el control (10 individuos por condición) fue que 2  $\mu\text{g}$  suprimen parcialmente la expresión de la proteína p38 mientras que 5 $\mu\text{g}$  de dsRNA específico de p38 bloquean completamente la expresión de la proteína de interés. La cantidad de dsRNA requerido para silenciar a p38 fue mayor a la que se ha empleado para interferir a otros genes blanco de *M. sexta*. Una probable razón es que p38 como otras MAPK sea un gen redundante en el genoma de este lepidóptero y por tanto, requiera de mas material de RNA doble cadena inicial para ser silenciado.

En el caso del silenciamiento de las larvas de mosquito mediante ingesta, la búsqueda de un medio adecuado para que las larvas de *Ae. aegypti* pudieran captar el dsRNA de

p38 en el epitelio intestinal representó dos principales retos: la naturaleza acuática de las larvas implica que la concentración de dsRNA (aún la mas alta: 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) al diluirse en volúmenes mayores a 1 mL (el volumen mínimo en el que se mantienen 10 larvas neonatas) la concentración se reduce en varios órdenes de magnitud y que las larvas al ser filtradoras incorporan partículas y no fluidos. Las primeras pruebas se hicieron con dsRNA desnudo de concentración conocida, posteriormente se emplearon bacterias que portan un plásmido con el fragmento de p38 que bajo la inducción de IPTG induce a la polimerasa T7 que sintetiza el dsRNA, sin embargo se desconoce la concentración de dsRNA producido. Ambas estrategias no tuvieron éxito; la siguiente estrategia experimental fue administrar el dsRNA en partículas sólidas que además permitieran que la concentración permaneciera estable. A la par obtuvimos el primer resultado positivo de silenciamiento en la línea celular de *A. gambiae* usando liposomas para transfectar las células, por tanto se decidió usar al Effectene para transportar al dsRNA al interior intestinal y posteriormente al interior celular. El éxito de ésta técnica no solo nos permitió entender la participación de p38 en la respuesta de *Ae. aegypti* al ser retado con Cry11Aa, sino desarrollar la primer técnica concreta para silenciar mediante alimentación a las larvas del mosquito *Ae. aegypti*. Esta novedosa estrategia experimental, está reportada por primera vez en Cancino-Rodezno *et al.*, 2010.

Cuando probamos mediante bioensayos la sensibilidad de las larvas silenciadas encontramos que las larvas de mosquito silenciadas en p38 se volvieron 10 veces mas sensibles a Cry11Aa que las larvas control. Y observamos que las orugas silenciadas en p38 fueron 8 veces más sensibles a la toxina Cry1Ab que las orugas silvestres. Nuestros resultados muestran la posibilidad de incrementar la acción de las toxinas Cry en larvas hipersensibles debido al bloqueo de una ruta de señalización específica (p38), lo cual podría tener aplicaciones biotecnológicas contra insectos plaga.

Previamente al inicio de ensayos proteómicos, realizamos una revisión exhaustiva en la literatura de publicaciones relacionadas con mecanismos de defensa eucariota ante infecciones bacterianas, con el objetivo de conocer posibles candidatos asociados a intoxicación con TFP en el proteoma de intestino de mosquito expuesto a Cry11Aa. Encontramos que los sistemas de señalización involucrados en sistema inmune innato (TLR/ Toll; TNF- $\alpha$ / Imd y JAK/STAT/Hop) se valen de un consenso de proteínas

conformado por: receptores, adaptadores, cinasas, factores transcripcionales, etc). Análogamente, los sistemas de respuesta de defensa contra TFP encontrados en la literatura, se valen de proteínas tanto constitutivas como inducibles al estímulo de las TFP. En el análisis proteómico tipo DIGE entre intestinos de *Ae. aegypti* retados con la CL<sub>10</sub> de Cry11Aa, con el equivalente equimolar de Cry1Ab y el control se encontraron solo dos proteínas estadísticamente diferentes, éstas fueron la subunidad beta de la ATPasa sintasa tipo F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> [*Aedes aegypti*] que se indujo y la endopeptidasa tipo serina [*Aedes aegypti*] que se reprimió. Debido a que ambas entidades protéicas están reportadas por participar en sistema inmune consideramos que la sobreexpresión de la primera se dio en función de contrarrestar el efecto tóxico de Cry, en el caso de la represión de la segunda especulamos que puede tratarse de un mecanismo de muerte celular altruista, que la toxina Cry dispare un mecanismo que invalide una posible respuesta de defensa mediada por la endopeptidasa tipo serina o que se trate de algún mecanismo que no hemos contemplado. Ambas proteínas son candidatos a silenciar. sin embargo si estas proteínas resultan indispensables para la sobrevivencia de los insectos, la técnica de RNAi rendiría fenotipos de muerte. Una de las razones por las que explicamos el bajo número de proteínas estadísticamente diferentes obtenidas del análisis de la CL<sub>10</sub> de Cry11Aa, es la correlación con el bajo número de genes de *Ae. aegypti* regulados diferencialmente obtenidos en un ensayo de microarreglos en el laboratorio del Dr. Sarjeet Gill. Los resultados obtenidos de un análisis de microarreglos que usó como material biológico individuos de *Ae. aegypti* retados con la CL<sub>10</sub> y la CL<sub>95</sub> de Cry11Aa fueron 156 genes regulados por la condición CL<sub>10</sub> de Cry11Aa vs 4594 genes modulados exclusivamente por la CL<sub>95</sub> de Cry11Aa. Lo anterior nos sugirió que la CL<sub>10</sub> de esta toxina es un estímulo al que las células de intestino de *Ae. aegypti* responden modulando un pequeño porcentaje de sus genes y por lo tanto, modulan aún menos proteínas. Posteriormente se optó por rediseñar el ensayo tipo DIGE, se planteó a la condición CL<sub>50</sub> de Cry11Aa como el estímulo dado a las larvas; y dado que el presente trabajo se enfocó a encontrar la respuesta de sobrevivencia celular y no la de muerte se eligió interrumpir el bioensayo a las pocas horas de haber iniciado, lo cual permitiría a las larvas ser disectadas en condiciones idóneas en las que hipotéticamente las células ya habrían iniciado una respuesta de defensa. En el experimento se consideraron 3

condiciones para asumir que la larva está intoxicada pero sin daño irreversible: Movilidad de las larvas (actividad de nado), integridad intestinal (firmeza del intestino disectado comparado con la de larvas no intoxicadas) e integridad que las proteínas (sin degradación y con un patrón general de spots en geles de doble dimensión similar al de la muestra control). Con estos criterios se estableció que el tiempo límite en el que las larvas retadas con la toxina Cry CL<sub>50</sub> conservan las características equiparables al control, fue de 5 h. El estímulo CL<sub>50</sub> implica *per se* que la respuesta de las larvas de *Ae. aegypti* de cuarto instar al término de 24 h será mixta. El 50% de la población morirá y el resto sobrevivirá. Sin embargo, transcurridas solo 5 h de bioensayo, todas las larvas viven y nuestra premisa es que toda la población podría presentar un proteoma de defensa o que desde tiempos tempranos las larvas mas sensibles disparan respuesta de muerte y las más tolerantes activan una respuesta de sobrevivencia, ambos escenarios nos resultan igualmente interesantes y sujetos a análisis proteómico. Por lo tanto, se considera a la CL<sub>50</sub> una condición ideal para observar respuesta de defensa o respuesta mixta a nivel proteoma. Este análisis se ha realizado ya y se encuentra en la fase final de la identificación de 47 puntos que se expresaron diferencialmente.

Consideramos que aunque p38 es una proteína candidato a encontrarse en un análisis proteómico de las células de insecto retadas con Cry, los proteomas analizados en este trabajo, no correspondieron al momento celular donde p38 se induce por la dosis y/o el tiempo de exposición a la toxina Cry11Aa .El trabajo “Caracterización de la respuesta intracelular de insectos hacia toxinas Cry”, tuvo por reto abrir una nueva línea de investigación en nuestro laboratorio, contestando distintas preguntas de manera inicial y generando nuevas interrogantes. Para abordar nuestros objetivos se requirió del uso de nuevas técnicas que por un lado pudieran rendir resultados sobre una proteína en particular (RNAi) o que hicieran posible un resultado global, es decir, un conjunto de proteínas (proteómica).

Los objetivos particulares del presente trabajo se dan continuidad mutuamente: Al probar que p38 está implicado en la respuesta de insectos hacia toxinas Cry, una pregunta inmediata es ¿cuales son sus sustratos? o ¿qué objetivos moleculares corriente abajo o corriente arriba de la ruta de p38 son los responsables de la(s) respuesta(s) fisiológica(s) hacia la toxina Cry? El análisis del proteoma de células intestinales resultante de la



intoxicación por Cry (tal como lo plantea nuestro objetivo particular 2) puede ayudar a resolver las preguntas anteriores revelando miembros de respuestas celulares previamente descritas en otros sistemas biológicos elicitados con PFT, o entidades protéicas nuevas, tales como factores transcripcionales, proteínas cinasas/fosfatasas, etc. cuya participación reste por elucidar en nuestro modelo de estudio. En ambos casos la estandarización de las técnicas usadas para alcanzar el objetivo particular 1 provee las herramientas necesarias para probar la función de los candidatos de interés que arroje el análisis proteómico.

En el presente trabajo se analizó la respuesta de *Ae. aegypti* y de *M. sexta* hacia la CL<sub>50</sub> de Cry11Aa y Cry1Ab respectivamente, encontrando en ambos casos que la MAPK p38 orquesta una respuesta de defensa. La propuesta que hace este trabajo al Modelo de Formación de Poro de Bravo (2004) se representa en la figura 19 R.

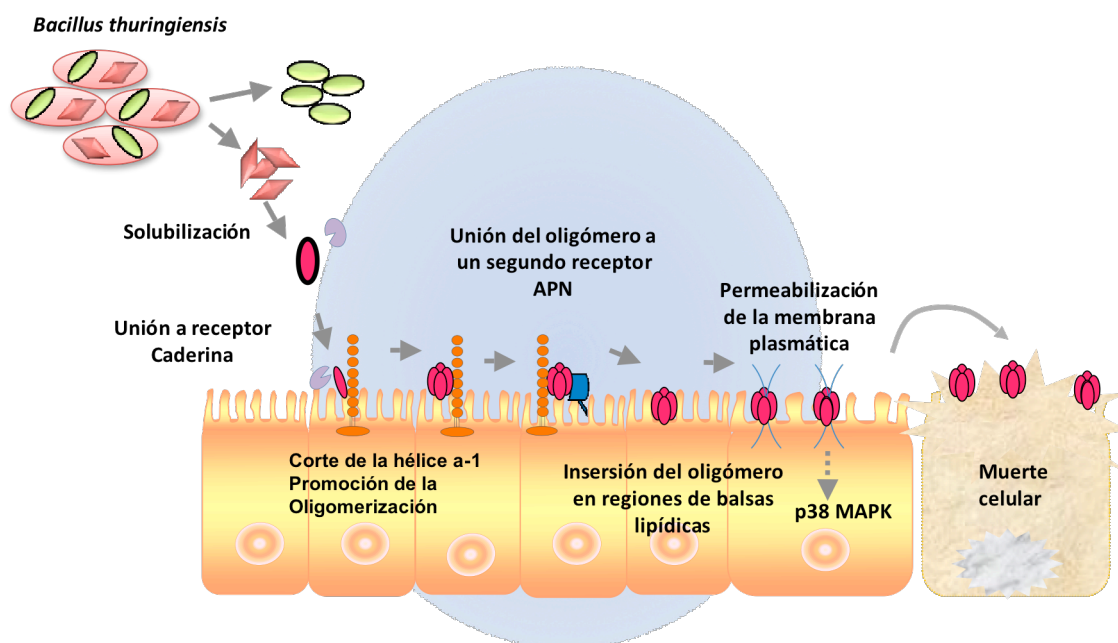


Figura 20 R. Aportación del presente trabajo al Modelo de Formación de Poro. La proteína p38 en ambos insectos se activa por fosforilación en presencia de la toxina Cry. Las mutantes afectadas en oligomerización de Cry no activan a p38, concluimos que p38 se fosforila en función de la formación de poro; p38 brinda una respuesta de sobrevivencia en células de díptero y lepidóptero.

## **CONCLUSIONES.**

Existe una diferencia en la expresión basal de mensajero y proteína de p38 en los insectos analizados:

En *M. sexta* la expresión es baja y se induce dramáticamente ante el reto con Cry1Ab.

En *Ae. aegypti* la expresión basal es mayor y el reto con Cry11Aa genera una respuesta moderada.

La proteína p38 en ambos insectos se activa por fosforilación en presencia de la toxina Cry. Las mutantes afectadas en oligomerización de Cry no activan a p38.

El silenciamiento de p38 en ambos insectos genera larvas hipersensibles a la toxina Cry específica. Por lo tanto p38 participa en la respuesta de sobrevivencia a la intoxicación con toxinas Cry.

El proteoma de *Ae. aegypti* bajo condiciones de intoxicación con la CL<sub>10</sub> y la CL<sub>50</sub> reveló proteínas diferenciales con respecto al control y particulares con respecto a los dos tratamientos.

## **PERSPECTIVAS.**

Algunas de las opciones que resultan interesantes para continuar este proyecto se enlistan a continuación:

Silenciar en nuestros modelos las proteínas diferenciales encontradas en el análisis del proteoma de intestino de larva de *Ae. aegypti* intoxicada con Cry11Aa: serine-type endopeptidase, la subunidad beta de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-type ATP sintasa beta, etc .

Silenciar en insectos las proteínas reportadas en otros trabajos que se activan como mecanismo de defensa celular contra TFP (ejemplo: Ire -UPR).

Buscar los blancos de p38 en nuestros modelos de estudio para tener más información sobre los mecanismos de defensa que son regulados por esta ruta de señalización.

Elegir otras proteínas que destaquen del análisis DIGE (por relevancia biológica o por presentar las mayores diferencias significativas en expresión entre control y tratamiento) para su silenciamiento.

Retar con la Cry específica a los organismos silenciados en los genes de interés y así delimitar su participación en la defensa celular.

**REFERENCIAS.**

- Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*.124(4):783-801.
- Aroian, R. and van der Goot, F.G. 2007. Pore-forming toxins and cellular non-immune defenses (CNIDs). *Current Opinion in Micro*. 10:57-61.
- Aronson, A.I., Beckman, W., and Dunn, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50:1-24.
- Arora, N., Hoque, M.E., Rajagopal, R., Sachdev, B., and Bhatnagar, R.K. 2009. Expression, purification, and characterization of pro-phenoloxidase-activating serine protease from *Spodoptera litura*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 72(2):61-73.
- Atapattu, D.N. and Czuprynski, C.J. 2005. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin induces apoptosis of bovine lymphoblastoid cells BL-3 via caspase-9 dependent mitochondrial pathway. *Infect Immunol* 3: 5504-5513.
- Baum, J.A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G.R., Feldmann, P., Ilagan, O., Jonson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M. *et al.* 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 25:1322–1326
- Barillas-Mury, S. G. and van der Goot, F.G. 2001. The bacterial toxin toolkit. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:530-537
- Baum, J.A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G.R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T. and Roberts, J. 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 25:1322-1326.
- Bischof, L.J., Kao, C.Y., Los, F.C., Gonzalez, M.R., Shen, Z., Briggs, S.P., van der Goot, F.G. and Aroian, R.V. 2008. Activation of the unfolded protein response is required for defenses against bacterial pore forming toxin *in vivo*. *PLoS Pathogens.* 4:1000 176.
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D. J. and Li, J. 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* 348:363-382.
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S.S., 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. *Biochim. Biophys. A.* 1667:38-46.
- Bravo, A., Gill, S.S. and Soberón, M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49:423-435.
- Braun, J. S., Sublett, J. E., Freyer, D., Mitchell, T. J., Cleveland, J. L., Tuomanen, E. I. and Weber, J. R. 2002. Pneumococcal pneumolysin and H(2)O(2) mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J. Clin. Investig.* 109:19–27.
- Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. 1999, Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol.* 23(4-5):329-344.
- Burns, D. L. 2003. Bacterial Protein Toxins. ASM Press, Washington, D. C.
- Cancino-Rodezno A., Porta H., Soberón M. and Bravo A.. 2009 Defense and death responses to pore forming toxins. *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.* 26: 65-94 .
- Cancino-Rodezno, A., Alexander, C., Villaseñor, R., Pacheco, S., Porta, H., Pauchet, Y., Soberon, M., Gill, S.S. and Bravo, A. 2010. The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect. Biochem.Mol. Biol.* 40: 1.
- Celedon G, Venegas F, Campos AM, Lanio ME, Martinez D, Soto C, Alvarez C, Lissi E. 2005. Role of endogenous channels in red blood cells response to their exposure to the pore forming toxin Sticholysin II. *Toxicon.* 1;46(3):297-307.
- Chang, C., Yu, Y.M., Dai, S.M., Law, S.K. and Gill, S.S. 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.
- Chen WJ, Tsai SM, Chen SL, Ko YC, and Fang AH. 1990. A study on transovarial transmission of dengue type 1 virus in *Aedes aegypti*. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi.* 23(4):259-70.

- Chen LZ, Liang GM, Zhang J, Wu KM, Guo YY, Rector BG. 2010. Proteomic analysis of novel Cry1Ac binding proteins in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Arch Insect Biochem Physiol.*73(2):61-73.
- Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK. 2004. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot.* 55(395):225-36.
- Craig, C.R., Fink, J.L., Yagi, Y., Ip, Y.T., and Cagan, R.L. 2004. A *Drosophila p38* orthologue is required for environmental stress responses. *EMBO Rep* 5(11):1058-63.
- Crickmore, N. 2005: Using worms to better understand how *Bacillus thuringiensis* kills insects. *Trends in microbiology* . 13(8):347-50.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf. E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. and Dean, D. H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *MMBR.* 62(3):807-813.
- Deretic, V. 2006. Autophagy as immune defense mechanism. *Curr. Opinion Immunol.* 18:375-382
- Encarnación, S., Hernández, M., Martínez-Batallar, G., Contreras, S., Vargas, M.C. y Mora, J. 2005. Comparative proteomics using 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry as tools to dissect stimulons and regulons in bacteria with sequenced or partially sequenced genomes. *Biological procedures online.* 7():117-35
- Feitelson, J.S., Payne, J. and Kim, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *BioTechnology* 10, 271–275.
- Feitelson, J.S. 1993. The *Bacillus thuringiensis* family tree. En: L.Kim (ed) *Advanced engineered pesticides.* 63-71 Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Fink, S.L. and Cookson, B.T. 2005. Apoptosis, pyroptosis and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 73:1907-1916
- Gekara, N. O., Groebe, L., Viegas, N. and Weiss, S. 2008. *Listeria monocytogenes* desensitizes Immune Cells to subsequent Ca<sup>2+</sup> Signaling via Listeriolysin O-Induced Depletion of Intracellular Ca<sup>2+</sup> Stores. *Infect. Immun.* 76: 857-862
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A. and Soberón, M., 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix  $\alpha$ -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* 513, 242-246.
- Gonzalez, M.R., Bischofberger, M., Pernot, L., van der Goot, F.G. and Freche, B. Bacterial. 2008. pore-forming toxins: The (w)hole story? *Cell Mol Life Sci.*65:493–507
- Gubler, J.D. 2001. Dengue Fever Viruses In: *Encyclopedia of Life Sciences.* Nature Publishing Group, London, [www.els.net](http://www.els.net).
- Griffits, J.S. y Aroian, R.V. 2005. Many roads to resistance: how invertebrates adapt to *Bt* toxins. *BioEssays* 27: 614–624.
- Guillon, M. 2004. Current World Situation on Acceptance and Marketing of Biological Control Agents (BCAS). International Biological Control manufacturers Association, Position Papers. <http://www.ibma.ch/pdf>
- Gurcel, L., Abrami, L., Girardin, S., Tschopp, J. y van der Goot, F.G. 2006. Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell* .126, 1135-1145.
- Gutierrez, M. G. , Saka, H. A. , Chinen, I. , Zoppino, F. C. , Yoshimori, T. , Bocco, J. L. and Colombo, M. I. (2007) Protective role of autophagy against *Vibrio cholerae* cytolysin, a pore-forming toxin from *V. cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 1829 – 1834.
- Harper, D.R. and Kutter, E. 2008. Biological control by micro-organisms. In: *In Encyclopedia of Life Sciences.* Nature Publishing Group, London, [www.els.net](http://www.els.net).
- Herlaar, E. and Brown, Z. 1999. p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol. Med. Today* 5:439.
- Ho, N.T., Keene, K.M., Olson, K.E. and Zheng, L. 2003. Characterization of RNA interference in an *Anopheles gambiae* cell line. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 949-957.
- Hunter-Fujita, F.R., Entwistle, P.F., Evans, H.F. y Crook, N.E. 1998. *Insect Viruses and Pest Management.* John Wiley and Sons, Ltd., West Sussex, England.344.
- Hoffmann, M.P., Zalom F.G. y Kuhar, T.P. 2006. Integrated Pest Management In: *Encyclopedia of Life Sciences.* Nature Publishing Group, London, [www.els.net](http://www.els.net).

- Hokkanen, H.M.T. 2001. Biological Control *In: Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, London, [www.els.net](http://www.els.net)
- Holt, R.A., Subramanian, G.M., Halpern, A., Sutton, G.G., Charlab, R., Nusskern, D.R. *et al.* 2002. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*. 298:129–49.
- Honeyman, M.C. and Harrison, L.C. 2004. Immunity: Humoral and Cellular *In: Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, London, [www.els.net](http://www.els.net).
- Huffman, D.L., Abrami, L., Sasik, R., Corbeil, J., van der Goot, G. and Aroian, R.V. 2004. Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101, 10995-1000
- Husmann, M., Dersch, K., Bobkiewicz, W., Beckmann, E., Veerachato, G. and Bhakdi, S. 2006. Differential role of p38 mitogen activated protein kinase for cellular recovery from attack by pore-forming *S. aureus*  $\alpha$ -toxin or streptolysin O. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 344, 1128–1134.
- Husmann, M., Beckmann, E., Boller, K., Kloft, N., Tenzer, S., Bobkiewicz, W., Neukirch, C., Bayley, H. and Bhakdi, S. 2008. Elimination of a bacterial pore-forming toxin by sequential endocytosis and exocytosis. *FEBS Lett.* 583, 337-344.
- Huw, D.D. 2008. Immune System. *In: Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, London, [www.els.net](http://www.els.net).
- Idone, V., Tam, C., Goss, J.W., Toomre, D., Pypaert, M. and Andrews, N.W., 2008. Repair of injured plasma membrane by rapid  $Ca^{2+}$  dependent endocytosis. *J. Cell Biol.* 180: 905-914.
- Jiménez-Juarez, N., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Gill, S.S., Soberón, M. and Bravo, A. 2007. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non toxic to *Manduca sexta* larvae. *J. Biol. Chem.* 282, 21222-21229.
- Jurat-Fuentes, J.L. and Adang, M.J. 2006. Cry toxin mode of action in susceptible and resistance *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 92 (2006) 166-171.
- Katayama H, Kusaka Y, Yokota H, Akao T, Kojima M, Nakamura O, Mekada E, and Mizuki E. 2007. Parasporin-1 a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis* induces  $Ca^{2+}$  influx and sustained elevation of the cytoplasmic  $Ca^{2+}$  concentration in toxin sensitive cells. *J. Biol. Chem.* 282:7742-775.
- Kim, D. H., Feinbaum, R., Alloing, G., Emerson, F. E. and Garsin, D. A. 2002. A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Science* 297: 623–626.
- Knowles, B. H., and Dow, J. A. T. 1993. The crystal d-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays* 15: 469–476.
- Kloft, N., Busch, T., Neukirch, C., Weis, S., Boukhallouk, F., Bobkiewicz, W., Cibis, I., Bhakdi, S. and Husmann, M. 2009. Pore-forming toxins activate MAPK p38 by causing loss of cellular potassium. *BBRC* 385: 503-506
- Kultz, D. 2003. Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *J Exp Biol.* 206:3119-3124.
- Lacy, D.B. and Stevens, R.C. 1998. Unraveling the structures and modes of action of bacterial toxins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:778-784
- Leclerc, V. and Reichhart, J.M. 2004 The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunol Rev* 198: 59–71.
- Lesieur, C., Vecsey-Semjn, B., Abrami L., Fivaz, M. and van der Goot F.G. 1997. Membrana insertion: the strategy of toxins. *Molecular Membrane Biology*, 14: 45-64.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- Loeb, M.J., Martin P.A.W, Narang, N., Hakim, R.S., Goto, S. and Takeda, M. 2001. Control of life, death and differentiation in cultured midgut cells of the lepidopteran *Heliothis virescens*. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Animal.* 37:348-352
- Mcneil P, and Kirchhause, t. 2005. An emergency response team for membrane repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 499-505
- Metcalf, R.L. and Metcalf, R.A. 1993. Destructive and useful insects: their habits and control. McGraw-Hill Book Company, Inc. New York.
- Mao, Y.B., Cai, W.J., Hong, G.J., Tao, X.J., Wang, L.J., Huang, Y.P., and Chen, X.Y., 2007. Silencing a cotton bollworm monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance to gossypol. *Nat. Biotechnol.* 25, 1307-1313.

- Medzhitov, R. and Janeway, C.A. Jr. 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 12;296(5566):298-300.
- Menestrina, G., and Dalla, S. M, 2001. Pore-forming toxins. *In: Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, London, [www.els.net](http://www.els.net).
- Meza, R., Nuñez-Valdez, M.E., Sánchez, J., Bravo, A., 1996. Isolation of Cry1Ab protein mutants of *Bacillus thuringiensis* by a highly efficient PCR site-directed mutagenesis system. *FEMS Microbiol. Lett.* 145, 333-339.
- Muñoz-Garay, C., Rodríguez-Almazán, C., Aguilar, J.N., Portugal, L., Gómez, I., Saab-Rincon, G., Soberón, M., and Bravo, A., 2009. Oligomerization of Cry11Aa from *Bacillus thuringiensis* has an important role in toxicity against *Aedes aegypti*. *Appl. Environ. Microbiol.*, *Appl Environ Microbiol*, 75, 7548-7550.
- Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, *et al.*, 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*.;316:1718–23.
- Ono, K., and Han, J. 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell. Signal.* 12:1, 1-13
- Palmer, M. 2001. The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolytins. *Toxicon* 39, 1681-1689
- Pauchet, Y., Wilkinson, P., Vogel, H., Nelson, D.R., Reynolds, S.R., Heckel, D.G. and French-Constant, R.H., 2009. Pyrosequencing the *Manduca sexta* larval midgut transcriptome: messages for digestion, detoxification and defence. *Insect Mol. Biol.*, 39:467
- Pigott, C.R. and Ellar, D.J. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev* 71(2):255–281
- Parker, M.W. and Fiel, S.C. 2005. Pore forming proteins toxins: from structure to function *Progress Biophys Mol. Biol* 88: 91-142
- Pinheiro V.B. and Ellar, D.J. 2006. How to kill a mocking bug? *Cellular Microbiology*. 8 (4) 545-557
- Rajamohan, F., Lee, M. K., and Dean, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*.;60:1–27.
- Ratner, A.J., Hippe, K.R., Aguilar, J.L., Bender, M.H., Nelson, A.L. and Weiser, J.N. 2006. Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins. *J. Biol. Chem.* 281, 12994–12998.
- Rasko, D.A., Alter, M. R. , Han, C. S. and Ravel, J. 2005. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Reviews*. 29(2):303-329.
- Ross, A. J. and Jarzembowski, E. A. 1993. Arthropoda (Hexapoda; Insecta) Pp. 363–426, In *M. J. Benton, ed. The fossil record*. Chapman & Hall, London
- Ruppert, E.E., Fox, R.S., and Barnes, R.D. 2004. *Invertebrate Zoology* (7 ed.). Brooks / Cole. pp. 523–524.
- Schorey, J.S. and Bhatnagar, S. 2008. Exosome function: from tumor immunology to pathogenbiology. *Traffic*. 9(6):871-881
- Stassen, M., Muller, C., Richter, C., Neudorfl, C., Hultner, L., Bhakdi, S., Waley, I. and Schmitt, E., 2003. The streptococcal exotoxin streptolysin O activates mast cells to produce tumor necrosis factor alpha by p38 mitogen-activated protein kinase- and protein kinase C-dependent pathways. *Inf. Imm*, 71, 6171-6177.
- Sifri, C.D., Begun, J., Ausubel, F.M., and Calderwood, S.B. 2003. *Caenorhabditis elegans* as a model host for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infect Immun*. 71, 2208–2217.
- Soberón, M., Pardo-López, L., López, I., Gómez, I., Tabashnik, B., and Bravo, A. 2007. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science* 318, 1640-1642.
- Sherman, I.W. 2001. Malaria *In: Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, London, [www.els.net](http://www.els.net).
- Sifri, C.D., Begun, J., Ausubel, F.M., and Calderwood, S.B. 2003. *Caenorhabditis elegans* as a model host for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infect Immun*. 71, 2208–2217.
- Stringaris, A.K., Geisenhainer, J., Bergmann, F., Balshüsemann, C., Lee, U., Zysk, G., Mitchell, T.J., Keller, B.U., Kuhnt, U., Gerber, J., Bäh, M., Michel, U. and Nau, R. 2002. Neurotoxicity of Pneumolysin, a Major Pneumococcal Virulence Factor, Involves Calcium Influx and Depends on Activation of p38 Mitogen Activated Protein Kinase. *Neurobiology of Disease*, 11: 355-368
- Thelestam, M. and Møllby, R. 1983. Survival of cultured cells after functional and structural disorganization of plasma membrane by bacterial haemolysins and phospholipases. *Toxicon* 21, 805–815.

- Valatis, A.P.2008. *Bacillus thuringiensis* pore-forming toxins trigger massive shedding of GPI-anchored aminopeptidase N from gypsy moth midgut epithelial cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 38, 6, 611-618
- Wishart, M.J. and Gu K.L. (1998) Protein Phosphatases. *In: Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, London, [www.els.net](http://www.els.net).
- Wu, D., Johnson, J.J. and Federici, B.A. 1994. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIV proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Mol. Microbiol.* 13, 965-972.
- Valeva, A., Walev, I., Gerber, A., Klein, J., Palmer, M. and Bhakdi, S. 2000. Staphylococcal alpha-toxin: repair of a calcium-impermeable pore in the target cell membrana. *Mol Microbiol.* 2000. 36(2):467-76.
- Vadlamudi, R. K., E. Weber, I. Ji, T. H. Ji, and Bulla, L.A. Jr. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270:5490-5494
- Villanueva, R. 1998. Tobacco Hornworm: *Manduca sexta* (Linnaeus) and Tomato Hornworm:*M. quinquemaculata*(Haworth)(Insecta:Lepidoptera:Sphingidae)UF/IFASEENY-31,<http://creatures.ifas.ufl.edu/field/hornworm.htm>.
- Woodgett, J.R. and Takahashi, M. 2006. Protein Kinases: Physiological Roles in Cell Signalling *In: Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, London, [www.els.net](http://www.els.net)
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B. Taussig, R., and Bulla, L.A. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 26 9897-990
- Zhao L, Pridgeon JW, Becnel JJ, Clark GG, and Linthicum KJ. 2009. Identification of genes differentially expressed during heat shock treatment in *Aedes aegypti*. *J Med Entomol.*; 46(3):490-5.
- Zhuang, M., Oltean, D. I., Gómez, I., Pullikuth, A. K., Soberón, M., Bravo, A. and Gill. S. S. 2002. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *Journal of Biological Chemistry.* 277: 13863-13872.

## **ANEXO DE MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **1) Cepas bacterianas y medios de cultivo.**

#### Cepas bacterianas.

Las cepas de Bt silvestres, transformadas o mutantes (Tabla 1 M.M.) fueron crecidas a 30°C en medio nutritivo de germinación y de esporulación (Tabla 2 M.M.). Todas las cepas de Bt fueron crecidas en medio Luria Bertani (LB), medio de esporulación (SP) y el medio HCT adicionados con 10 µg/ mL de eritromicina.

Adicionalmente, se emplearon cepas de *E. coli* XL1-blue y SCS1100 de fenotipo dam<sup>-</sup> dcm<sup>-</sup> (libre de metilasas), para experimentos de clonación y transformación respectivamente. Los antibióticos usados (ampicilina 100µg/mL y eritromicina 10µg/mL) se usaron en función de la resistencia conferida por los plásmidos empleados.

#### Medios de Cultivo.

Para la preparación de 1 litro de LB (Tabla 2 M.M.) todos los reactivos se disolvieron en 600 mL de agua, se ajustó el pH a 7.0 (con NaOH; si se requiere medio sólido, se agrega Bacto-agar) y se aforó al volumen final deseado. Posteriormente el medio se esterilizó durante 20 min a 15 lb/sq<sup>2</sup>. El antibiótico requerido se adiciona una vez que el medio está a temperatura ambiente.

El medio HCT (Tabla 2 M.M.) se preparó disolviendo la Bacto-triptona y los Casaminoácidos en 992 mL agua destilada. Posteriormente se ajustó el pH (Tabla 2 M.M) con KOH y, en caso de requerirse, se añadió el Bacto-agar. Se esterilizó el medio durante 20 min a 15 lb/sq<sup>2</sup>. Una vez que el medio alcanzó la temperatura ambiente se agregaron las soluciones 1, 2, 3, 4, y glucosa previamente esterilizadas por filtración. Al final se adicionó el antibiótico.

Para preparar el medio SP se esterilizaron previamente las 3 soluciones stocks y una vez que alcanzaron la temperatura ambiente se inició la preparación del medio. Se mezclaron los 3 primeros reactivos (Tabla 2 M.M.) con el stock 1, se ajustó el pH (Tabla 2 M.M) de la mezcla, para medio sólido se añadió el Bacto-agar y se aforó a 1 L. Se esterilizó durante 20 min a 15 lb/sq. Una vez que disminuyó la temperatura se agregaron los stocks 2 y 3.



Tabla 2 M.M. Medios de cultivo bacteriano.

Medio	Composición (1Lt)	pH
LB (Luria-Bertani)	Bacto-peptona 10g Bacto-extracto de levadura 5g NaCl 10g Bacto-agar 15 g ( opcional)	7
HCT	Bacto-triptona 5g Casaminoácidos 2g Bacto-agar 15g (opcional) Solución 1: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3.4g llevar a 50 ml H <sub>2</sub> O Solución 2: MnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 12mg, MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O 0.16mg, ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 1.4mg llevar a 1 mL H <sub>2</sub> O Solución 3: Fe(SO <sub>4</sub> ) 7H <sub>2</sub> O 20 mg H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1N 1 mL llevar a 10 mL Solución 4: CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O 2 mg llevar a 10mL Glucosa al 3%	7.25
SP (Medio de esporulación/ Sporulation medium)	Caldo nutritivo 8g MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 0.25g KCl 1g Bacto-agar 15g Stock 1: MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O (10 mM) 1mL Stock 2: Fe(SO <sub>4</sub> ) 7H <sub>2</sub> O (10 mM en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1N) 1.6 mL Stock 3:CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (0.5M) 800 µL	7

## 2) Transformación de *Bt israelensis* con Cry1Ab.

### Preparación de células dam<sup>-</sup> dcm<sup>-</sup>.

- Se preparó un preinóculo con 5 mL de medio LB y una asada de la cepa de *E. coli* SCS1100, el cual se incubó por 12 h a 37°C.
- Con 2 mL del precultivo se inocularon 100 mL de LB líquido fresco en un matraz que se agitó a 37°C hasta alcanzar la densidad óptica (DO) de 600nm (para leer la densidad óptica se ocupó el espectrofotómetro Pharmacia LKB Ultraspec II)

- c) El matraz con el cultivo de densidad óptica deseada se enfrió en hielo por 5 min para posteriormente centrifugar 10 min a 1,400 x g a 4°C.
- d) El precipitado celular se resuspendió en 10 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM con glicerol estéril al 15%.
- e) La resuspensión se incubó 30 min en hielo y se centrifugó 10 min a 1,400 x g
- f) El paquete celular se resuspendió en 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM; las células competentes se mantuvieron a -80 °C hasta su uso.

### Transformación.

- a) A las células competentes se pusieron en contacto con 40µg de DNA del plásmido pHT315-Cry1Ab y se incubaron en hielo por 30 min.
- b) Las células se sometieron a choque térmico a 42°C por 2 min.
- c) Se incubaron en hielo por 5 min.
- d) Las células se recuperaron en 800 µL de LB a 37°C con agitación.
- e) 250 µL de las bacterias se esparcieron en LB ampicilina (100µg/mL) en medio sólido y se crecieron a 37°C/24 h o hasta que se observaron colonias.
- f) Se verificó el éxito de la transformación mediante PCR en colonia y secuenciación de nucleótidos.

### **3) Purificación de cristales protéicos de *Bt*.**

- a) Las cepas Cry1Ab silvestre, la transformada en 4Q7 y la mutante R99E; así como la Cry11Aa silvestre y la mutante R90E, se crecieron en cajas de LB con eritromicina 10µg/mL a 30° C.
- b) Una vez que se verificaron al microscopio óptico cultivos sincronizados en estado vegetativo, se tomaron las asadas correspondientes para estriar varias réplicas en HCT sólido (Cry1Ab) o SP (Cry11Aa) suplementado con eritromicina 10µg/mL. Los cultivos se dejaron esporular a 30° C un mínimo de 48 h.
- c) A partir de este tiempo se evaluó al microscopio óptico el estado de los cultivos hasta alcanzar completamente la fase de esporulación; el material biológico se recuperó de la caja cuando se apreció una producción cercana al 90% del cristal.
- d) El paquete celular se centrifugó 10 min a 8,000 x g, la pastilla resultante se resuspendió en 30 mL de agua adicionada con 1 mM de PMSF (phenylmethil sulfonil fluoride).
- e) El inciso "d" se repitió 4 veces.
- f) La pastilla resultante se resuspendió en 5 mL de buffer TTN (Tris 30 mM, NaCl 300 mM Triton X-100 al 0.1% pH 7.2)
- g) La muestra se sonicó mediante 5 pulsos de un min a 20 watts; se alternó cada pulso con un min de reposo en hielo.
- h) Para aislar el cristal de otros componentes celulares, se prepararon anticipadamente gradientes discontinuos de sacarosa (6 mL de cada gradiente/ 2 mL de células de *Bt*) de cada uno de los siguientes porcentajes: 84, 79, 72 y 69 % en buffer TTN).
- i) Se separaron 2 mL de células de *Bt* en los gradientes de sacarosa centrifugando a 92,500 x g durante 20 min a 15°C en ultracentrífuga Beckman.

- j) Se dividieron las fracciones por su densidad y se lavaron de manera independientemente con agua miliQ más tritón al 0.01% y fueron centrifugadas a 8,000 x g por 10 min.
- k) Se repitió el proceso anterior 4 veces o hasta que se retiró completamente la sacarosa de las fracciones de cristales o esporas-cristales.
- l) Cada pastilla libre de sacarosa se resuspendió de forma independiente en buffer Tris 50 mM pH 8 más PMSF 1 mM.
- m) Las muestras resultantes se observaron al microscopio para verificar que las fracciones F1 y F2 (correspondientes a la sedimentación en los gradientes menos densos por tener un menor peso molecular) contuvieran la mayoría de cristales y estuvieran libres de esporas; y que la F3 y la F4 hubieran concentrado la espora cristal.

#### **4) Cuantificación de proteínas con reactivo de Bradford.**

- a) El reactivo de Bradford (Biorad) se diluyó en agua destilada usando la proporción 1:4, reactivo de Bradford: agua mili Q (solución de Bradford).
- b) Se adicionaron 5  $\mu$ L de cada muestra en 995  $\mu$ L de la solución de Bradford de forma independiente.
- c) Cada muestra se cuantificó mediante espectrofotometría midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm (Farmacia LKB Ultraspec II).
- d) Este valor de absorbancia se interpoló usando una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) que abarcó un rango de concentraciones de 1 a 20  $\mu$ g/mL para obtener el valor de concentración de proteína de las muestras.

#### **5) Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).**

Los SDS-PAGE se prepararon al 10 ó 12%, tal como se describe por Laemmli *et al.* (1970). Se cargaron de 2 a 30  $\mu$ g de proteína total, según conviniera por pozo. Los geles de poliacrilamida fueron teñidos con distintos métodos dependiendo de la sensibilidad requerida: Blue Stain (Reagent-ready to use, Thermo Scientific, USA), funciona para detectar hasta 100 ng por banda o mancha protéica ("spot"). Para mayor sensibilidad en la detección de proteínas se usó el Coomassie coloidal (Coomassie blue R-250, Biorad, México), cuyo límite de detección es 10 ng de proteína; ó la tinción de plata que es capaz de detectar hasta 1 ng de proteína en el gel de poliacrilamida.

#### **6) Tinción.**

##### Coomassie coloidal.

Para detectar las proteínas en geles de doble dimensión mediante colorante visible con suficiente sensibilidad, se usó la técnica de Anderson (1991). Todas las incubaciones requirieron de agitación suave y se uso agua Mili Q.

- a) Los geles de poliacrilamida se depositaron en charolas que contuvieran la solución de fijación (50% etanol, 3% ac. Fosfórico) y se incubaron en agitación suave durante un mínimo de 2 h.

- b) Se removió la solución fijadora y se lavó cada gel con agua tres veces en intervalos de 20 min.
- c) Después del último cambio de agua se adicionó la solución de pre-tinción (34% metanol, 3% ácido fosfórico, 17% (w/v) sulfato de amonio).
- d) Se incubó una hora y posteriormente se añadieron 0.35 g de Commasie R-250 por cada litro de solución.
- e) La solución de tinción estuvo en contacto con los SDS-PAGE 24 h o hasta que las manchas protéicas aparecieron.
- f) Se retiró la solución de tinción y se lavó con agua mili Q hasta que el trasfondo azul fue eliminado, permitiendo el mejor contraste entre los puntos proteicos y el resto del SDS-PAGE.
- g) Para desteñir el gel y volver a teñirlo con otro método se usó la solución de 50% metanol y 10% de ácido acético de 2 h hasta durante toda la noche, con al menos un cambio de la solución.

### Plata.

Todas las incubaciones requirieron de agitación suave y se usó agua Mili Q.

- a) Los geles de poliacrilamida se fijaron con 50% metanol y 10% de ácido acético por 2 h mínimo.
- b) Cada gel se lavó 3 veces con 50% etanol durante periodos de 20 min.
- c) Se retiró el último lavado y se adicionó la solución de pretratamiento que consta de 0.2g/litro de tiosulfato de sodio, se incubó por 2 min.
- d) Se lavó con agua 3 veces por 20 s.
- e) Se adicionó la solución impregnante (Nitrato de plata 2 g/L y formaldehído 0.75 mL/litro) y se incubó durante una h.
- f) Se enjuagó con agua 3 veces durante 20 seg.
- g) Se usó la solución reveladora (Carbonato de sodio 60 g/L, tiosulfato de sodio 20 mL/L y formaldehido 0.5mL/L) el tiempo necesario para que la reacción revele los puntos proteicos.
- h) Se detuvo la reacción con ácido acético al 1%.
- i) Después de 20 min se puede cambiar la solución de ácido acético al 1% por agua mili Q.

### **7) Solubilización de cristales y tripsinación (activación).**

#### Cry11Aa.

- a) Los cristales de Cry11Aa se centrifugaron a 8,000 x g durante 10 min y se descartó el sobrenadante.
- b) El paquete de cristales se resuspendió en un volumen igual al inicial de NaOH 100 mM. Se incubó 1 h a 4° C y se centrifugó bajo las mismas condiciones.
- c) Se recuperó el sobrenadante y se ajustó el pH a 9 con Tris/HCl 1M pH 8 usando 1/8 del volumen inicial.
- d) Se determinó la concentración por el método de Bradford y mediante un SDS-PAGE se verificó el peso esperado de 65 KDa.

- d) Se calculó la cantidad de tripsina adecuada (1:50 enzima:proteína) y se incubó la mezcla durante 2 h a 25°C.
- e) La reacción se detuvo agregando PMSF en una concentración final de 1 mM.
- f) En este punto se determinó nuevamente la concentración de proteína por método de Bradford y se corroboró en un SDS-PAGE al 12% el peso teórico de los fragmentos de la proteína (32 y 34 kDa).

### Cry1Ab.

- a) Los cristales de Cry1Ab se centrifugaron durante 10 min a 8,000 x g, el paquete de cristales se resuspendió en un volumen igual al inicial de buffer carbonatos pH 10.5 y  $\beta$ -mercaptoetanol 0.02%; se incubaron por 2 h a 37° C con agitación suave.
- b) Después la mezcla se centrifugó a 600,000 x g por 20 min y se recuperó el sobrenadante.
- c) Se cuantificó la proteína por método de Bradford y se corrió un SDS-PAGE al 10% para verificar la protoxina de 130 kDa.
- d) La protoxina solubilizada se ajustó a pH 8.5 con buffer tris 1M pH 8 (TRIS HCl) y después se agregó tripsina (1:20 tripsina: proteína) y se incubó 2 h a 37°C. con agitación suave.
- e) La reacción se detuvo con PMSF 1 mM y se centrifugó 10 min a 8,000 x g.  
Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó proteína por método de Bradford, se corrió un gel al 10% que verificó que la tripsinación rindió una proteína de 60 kDa.

### **8) Crecimiento de la línea celular 4A3A.**

La línea celular de mosquito 4A3A de *Anopheles gambiae* (Muller, 1998) fue seleccionada como modelo de estudio, ésta se generó a partir de tejido larvario epitelial.

- a) La líneas 4A3A se creció en 5 ml de medio de GIBCO™ (Schneider's Drosophila Medium 1X Gibco, Invitrogen) con suero fetal bovino al 10% en cajas de 25 cm<sup>2</sup> a temperatura controlada de 27 °C.
- b) Las cajas se inocularon con una densidad inicial de 40,000 células/cm<sup>2</sup> y los cultivos se mantuvieron en incubación por 3 días aprox., hasta alcanzar confluencia (densidad de 250,000 células/cm<sup>2</sup>).
- c) Las células se mantuvieron como cultivo celular homogéneo y viable hasta las 30 generaciones celulares; resembrando en cajas de cultivo nuevas cada tercer día. Para ensayos de toxicidad, las células de dípteros fueron sembradas en cajas de 96 pozos a alta densidad (50,000 células/pozo) y para ensayos de transfección y silenciamiento, en cajas de 24 pozos a baja densidad (50,000 células/ pozo).

### **9) Ensayos de toxicidad.**

Se usó homodímero de etidio (EthD-1 de Molecular Probes, Invitrogen, EUA) como indicador de muerte celular. El EthD-1 es un marcador fluorescente con picos de absorción y emisión a 528 y 617 nm, respectivamente, que solo penetra a las células cuya membrana ha sido dañada y se une con alta afinidad a ácidos nucleicos; una vez unido incrementa la intensidad de emisión hasta 40 veces y mediante un microscopio de

fluorescencia invertido obtener las imágenes a partir de las cuales se estimó el número de células muertas midiendo la intensidad de emisión al excitar selectivamente el EthD-1

a) Se inocularon células en cajas de 96 pozos de fondo plano a una densidad de 50,000 células/pozo en medio Schneider's Drosophila (1X) en un volumen de 189  $\mu\text{L}$ , (ensayo con 7 condiciones; se realizó por triplicado).

b) Se incubaron las células recién sembradas durante 1h a 27° C para permitir su adherencia al fondo de los pozos.

c) Se adicionó la toxina Cry11Aa activada en distintas concentraciones y en un volumen final igual de 10  $\mu\text{L}$  (Concentraciones 0, 5, 20, 30, 40 y 50 nM) y control positivo de muerte (Tritón al 0.1%).

d) Posteriormente se agregó 1 $\mu\text{L}$  del fluoróforo EthD-1 en la concentración recomendada por el fabricante.

e) La caja de 96 pozos se agitó con suavidad durante 1 min.

f) Se incubó la reacción por 1 h a 27°C.

g) Se adquirieron las imágenes usando un microscopio invertido en 10X en el canal rojo de fluorescencia con la cámara Nikon Coolpix 4500, apertura 3.1 y exposición 0.5 s (Nikon, )).

h) Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa Image J (NIH).

## 10) Bioensayos.

### M. sexta.

Para bioensayos de *M. sexta* se usaron distintas concentraciones de espora cristal, desde 0.1 a 2,000 ng/cm<sup>2</sup>.

a) Las cantidades de espora cristal calculadas fueron resuspendidas en 35  $\mu\text{L}$  finales y fueron aplicadas en la superficie de la dieta previamente solidificada en cajas de 24 pozos como ha sido previamente descrito (Gomez *et al.*, 2002). Cada condición fue realizada por sextuplicado.

b) Las larvas de segundo instar fueron colocadas individualmente en un pozo y se protegieron con plástico adherente con orificios para permitir la aireación durante 7 días.

c) Después de 7 días se evaluó la mortalidad de la población ensayada, la concentración letal de la media poblacional (LC<sub>50</sub>), se estimó descargando los datos en el programa Probit analysis (Polo-PC LeOra Software).

Con concentraciones letales de toxina Cry1Ab cercanas a la LC<sub>50</sub> (De 1 a 15 ng/cm<sup>2</sup>) se realizaron los ensayos de intoxicación *in vivo* con larvas de segundo instar de *M. sexta* probando tiempos de consumo de la espora cristal desde 30 min hasta 7 días.

### Ae. aegypti.

Para bioensayos de *Ae. aegypti* se usaron distintas concentraciones de espora cristal, desde 5 a 10,000 ng/mL.

a) La espora cristal Cry11Aa fue resuspendida en un volumen no mayor a 25  $\mu\text{L}$  finales.

b) La toxina se depositó en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  en vaso estándar con 10 larvas de cuarto instar cada uno.

c) Después de 24 h se evaluó la mortalidad de la población ensayada y la  $LC_{50}$  se estimó mediante los datos descargados en el programa Probit analysis (Polo-PC LeOra Software).

Para los ensayos de intoxicación *in vivo* con larvas de cuarto instar de *Ae. aegypti*, se alimentaron un mínimo de 30 larvas (10 larvas por vaso ensayado) para cada condición, probando diferentes concentraciones de espora cristal a diferentes tiempos de consumo de dieta con toxina (de 50 a 2000 ng/mL desde 30 min hasta 24 h).

Los intestinos de las larvas de *M. sexta* y *Ae. aegypti* bajo tratamiento y controles fueron disectados para la obtención de RNA y proteína.

### 11) Diseño de oligonucleótidos específicos.

Los oligonucleótidos para amplificar los genes de la ruta de p38 y genes control, se diseñaron sobre las secuencias reportadas en la base de datos para *Ae. aegypti* y *A. gambiae*. En el caso de *M. sexta* se usaron marcadores de secuencia expresada o EST (acrónimo del inglés Expressed Sequences Tag) proporcionados por el Dr. Pauchet para diseñar los oligonucleótidos (Tabla 3 M.M.). Se usó el programa Oligo4 (Agilent Technologies-Stratagene Products) para diseñar oligonucleótidos sin estructura secundaria.

### 11) Aislamiento de RNA de intestino de larvas y RT PCR.

Se obtuvo RNA total a partir de cultivo celular, intestino de *M. sexta* o intestino de *Ae. aegypti* según instrucciones del fabricante (RNeasy Project Kit, Qiagen), el RNA se cuantificó usando el Nano Drop (Thermo Scientific).

El RT-PCR se realizó de la siguiente manera:

- a) 1  $\mu$ g de RNA se diluyó en agua libre de RNAsas para obtener la concentración 0.1 $\mu$ g/ $\mu$ L.
  - b) Se mezclaron 10  $\mu$ L de RNA 0.1 $\mu$ g/ $\mu$ L más 1  $\mu$ L de oligo-DT 0.8 $\mu$ g/ $\mu$ L (Roche) y 4  $\mu$ L de dNTP mix (dATP,dCTP,dTTP,dGTP; cada uno 10 mM) (Roche).
  - c) La mezcla resuspendida se calentó a 65°C durante 5 min.
  - d) Posteriormente se incubó en hielo durante 1 min.
  - e) Para completar la reacción se añadieron los siguientes reactivos:
    - 4  $\mu$ L Buffer de reacción 5x (Invitrogen)
    - 1  $\mu$ L DTT 0.1 M (Invitrogen)
    - 1  $\mu$ L RNase out (Invitrogen)
    - 1  $\mu$ L Superscript III (Invitrogen).
  - f) La mezcla se resuspendió y se incubó durante 1h a 50 ° C.
  - g) Al finalizar, la enzima se inactivó calentando por 15 min a 70°C.
- Se usaron los oligonucleótidos específicos para p38 o SEK, actina o proteína ribosomal S3 (RPS3) (Tabla 3 M.M.).

## 12) qRT-PCR (PCR Cuantitativo o PCR en tiempo real).

El PCR cuantitativo se realizó sobre las muestras de RNA de intestinos de larva de *M. sexta* tratados con 5 ng de toxina Cry1Ab a tiempo 0, 30 min, 2, 24, 48 h y 7 días. La integridad de las muestras fue verificada mediante geles de agarosa adicionados con Tiocianato de guanidina para posteriormente ser analizadas por la compañía EUROFINSDNA (Alemania)

<http://www.eurofindna.com/de/home.html>><http://www.eurofindna.com> .

El PCR en tiempo real utilizó al fluoróforo SYBR green que se une y marca solamente al DNA de doble cadena. Los valores de expresión relativa fueron determinados al normalizar los valores de expresión del gen de interés (p38) a los valores de expresión de los controles endógenos mediante el método  $\Delta\Delta Ct$  (Livak, *et al.*, 2001). Todas las muestras fueron normalizadas con respecto a la muestra control (tiempo 0) El Método  $\Delta\Delta Ct$  requiere del conocimiento del valor del ciclo umbral ( $Ct = \text{cycle threshold}$ ) tanto del gen de interés (I) como del gen housekeeping o endógeno (E). El  $Ct$  se define por el número del ciclo de PCR que se encuentra en la fase exponencial de la curva de amplificación en el que se detecta fluorescencia emitida, es decir, producto amplificado. Se realizaron 2 análisis independientes: del gen de interés p38 vs el control endógeno actina y el gen de interés p38 vs el gen endógeno correspondiente a la proteína ribosomal S3 (RPS3); donde ambos análisis mostraron la misma tendencia. Para obtener los valores de expresión relativa se usaron las siguientes fórmulas:

$$\Delta Ct = (ICt - ECt)$$

$$\Delta\Delta Ct_n = \Delta Ct_{M_0} - \Delta Ct_{M_n}$$

$$\text{expresión relativa del gen al tiempo } n = 2^{-(\Delta\Delta Ct_{M_n})}$$

Donde:

ICt= Ciclo umbral del gen de interés

ECt= Ciclo umbral del gen housekeeping o endógeno

$\Delta Ct_{M_0}$ = delta Ct de la muestra Tiempo 0

$\Delta Ct_{M_n}$ = delta Ct de la muestra Tiempo n

Donde:

n= (0,1,2,3,4,5)

## 13) Síntesis de dsRNA.

a) Los productos parciales de p38 de *M. sexta* y *Ae. aegypti* y sek de *A. gambiae* se amplificaron por PCR mediante los oligonucleótidos específicos (Tabla 3 M.M.).

b) Los productos de PCR se limpiaron con el sistema Mini elute (Qiagen).

c) Los fragmentos se clonaron en el vector Topo, del topo TA Cloning Kit (Invitrogen) según instrucciones del fabricante.

d) Posteriormente se subclonaron en el vector pLitmus28i New England. Inc. (New England Biolabs).

e) La síntesis de dsRNA se realizó usando el HiScribe RNAi Transcription Kit New England. Inc. (New England Biolabs).

e) Se limpió la reacción con Mini elute kit (Qiagen).



f) Se cuantificó por Nano drop (Thermo Scientific) y se verificó el peso del fragmento y su abundancia por gel de agarosa.

#### **14) Administración de dsRNA a línea celular.**

Para la transfección se usó el Effectene kit (Qiagen.), que contiene liposomas como vehículos para introducir el dsRNA a las células.

a) 50,000 células se sembraron con suero y medio Schneider's Drosophila Medium (1X) en cajas de 24 pozos, el cultivo reposó por 1 hora para que las células recuperaran adhesión al fondo del pozo.

b) 50 µg de dsRNA fueron llevados a 50µL con buffer DNA-condensation (EC)

c) Se adicionaron 50 µL de Enhancer (Qiagen,) y se mezclaron con vortex 5 seg.

d) La reacción se incubó por 5 min a temperatura ambiente.

e) Se añadieron 60 µL de Effectene y la mezcla se resuspendió y se incubó por 10 min a temperatura ambiente.

f) Simultáneamente las células ya adheridas al pozo y antes de ser tratadas con el dsRNA encapsulado en Effectene, fueron lavadas con PBS 1X estéril.

g) Se depositó en la caja con células la mezcla dsRNA-Effectene, antibiótico en solución (estreptomicina 1.2 µg/ mL) y el medio Schneider's Drosophila Medium (1X) fresco (sin suero), necesario para llevar a un volumen final de 1 mL.h) La caja se agitó suavemente durante 1 min.

i) El cultivo tratado se creció a 27°C durante 3 días.

#### **16) Administración de dsRNA a larvas.**

##### *M. sexta.*

Las concentraciones administradas para manduca fueron 2µg/ µL y 5µg/ µL de dsRNA de p38 desnudo y específico (unidosis) en larvas neonatas.

a) 150 larvas recién eclosionadas fueron privadas de alimento y líquidos durante al menos 5 h.

b) Las larvas fueron separadas en 3 grupos: alimentadas con buffer (control), alimentadas con 2 µg de p38-dsRNA y 5 µg de p38-dsRNA eluido en buffer EB (Qiagen) cada uno de los 3 grupos fueron alimentados un individuo a la vez con 1µL de la solución correspondiente.

c) En cuanto cada larva terminó de ingerir su dosis, fue depositada en una caja con alimento y con humedad.

d) Cuando las larvas de *M. sexta* se desarrollaron hasta el 2do instar fueron disectadas para obtener su intestino (con o sin previo reto con toxinas) o se pusieron bajo condiciones de bioensayos.

*Ae. aegypti*

La cantidad de p38-dsRNA administrado por larva neonata de *Ae. aegypti* fue de 1 $\mu$ g, el dsRNA específico para p38 fue administrado en liposomas (Effectene Transfection reagent, Qiagen).

- a) 200 larvas de mosco eclosionaron en agua libre de alimento.
- b) 200  $\mu$ g de p38-dsRNA fueron llevados a un volumen final de 4 mL con buffer EC (Qiagen).
- c) Se adicionaron a la mezcla 0.8 mL of Enhancer buffer (Qiagen), se agitó por vortex y se incubó 5 min a temperatura ambiente.
- d) La mezcla se adicionó con 1.3 mL de Effectene, se resuspendió y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min.
- e) Transcurrido el tiempo, la mezcla se lleva con agua a 10 mL en un recipiente de fondo plano donde también son depositadas las 200 larvas de mosco.
- f) Las larvas fueron mantenidas a este volumen 16 h.
- g) Posteriormente las larvas fueron transferidas a un volumen de 200 mL de agua limpia y fueron alimentados con dieta durante 7 días hasta alcanzar el cuarto instar. En la tabla 3 R. se resumen las estrategias experimentales probadas hasta encontrar las condiciones de silenciamiento ideales

Tabla 3 R. Estrategias experimentales de silenciamiento ensayadas para interterferir genes en larvas de *Ae. aegypti*.

No. de larvas	Con c. Del dsRNA	Disponibilidad del dsRNA	Tiempo de tratamiento	No. de administraciones	Estadio de la larva durante la administración	Silenciamiento por dsRNA (Western blot)
10	24 $\mu$ g/5 mL	desnudo	12 h	1	neonatas	negativo
10	24 $\mu$ g/10 mL	desnudo	24 h	1	neonatas	negativo
10	24 $\mu$ g/10 mL	desnudo	24 h	1	Primer instar	negativo
10	desconocida	<i>E. coli</i>	7 días	3	Primer instar	negativo
10	10 $\mu$ g/10 mL	Effectene	16 h	1	neonatas	positivo

## 17 Extracción de proteínas totales.

### De línea celular 4A3A.

- a) Se obtuvo la proteína total despegando las células del fondo y decantándolas junto con el medio de cultivo en un tubo para centrifugarlas a 8,000 x g durante 5 min a temperatura ambiente.
- b) Se retiró el sobrenadante del paquete celular y se le añadieron 980  $\mu$ L de CellLytic M Cell Lysis Reagent (Sigma) adicionado con 20  $\mu$ L de inhibidores de proteasas 50 X (Complete; Roche).
- c) Las células se homogenizaron en hielo.
- d) Se sonicó la muestra en hielo mediante 3 pulsos de 10 s a 20 watts (Supersonic Multiprocessor, Hielscher); se alternó cada pulso con un min de reposo en hielo.
- e) Se centrifugó 10 min a 8,000 x g a 4° C, el sobrenadante se colectó y se cuantificó por el método de Bradford.

### De intestino de larva de *Ae. Aegypti*

- a) Se disectaron los intestinos de larva de 4<sup>o</sup> instar al microscopio.
- b) Cada intestino fue sumergido y enjuagado en una gota de inhibidores de proteasas 10X (Complete; Roche).
- c) Inmediatamente después, cada intestino se depositó en el buffer de lisis (BL) (7 M urea/ 2 M thiourea/ 4% CHAPS y 40 mM DTT) en hielo. 150 mL de BL son suficientes para 50 intestinos.
- d) Se congelaron las muestras a -80° C al menos por 24 h.
- e) Se descongelaron las muestras en hielo y se homogenizaron en frío.
- f) Se sonicó cada muestra mediante 3 pulsos de 10 s a 20 watts en hielo; se alternó cada pulso con 1 min de reposo también en hielo.
- g) Las muestras se limpiaron de los restos celulares y moléculas no protéicas mediante el Kit Clean Up (Amersham G.E. Healthcare) tal como lo indica el fabricante.
- h) Al terminar el proceso se cuantificaron las muestras usando el kit 2D Quant (Amersham G.E. Healthcare).

### De larvas de *M. sexta*

- a) Se disectaron los intestinos de larvas de 2do instar y fueron enjuagados inmediatamente en 50 µL de inhibidores de proteasas 50 X (Complete; Roche).
- b) Se depositaron a la brevedad en 490 µL de CellLytic M Cell Lysis Reagent (Sigma) adicionado con 10µL de inhibidores de proteasas 50 X (Complete; Roche).
- c) Los intestinos se homogenizaron en hielo.
- d) Cada muestra se sonicó en hielo mediante 3 pulsos de 10 seg a 20 watts; cada pulso se alternó con 1 min de reposo en hielo.
- e) Se centrifugaron las muestras 10 min a 8,000 x g a 4°C, el sobrenadante se colectó y se cuantificó por el método de Bradford.

### Obtención de proteínas fosforiladas.

Adicionalmente a los métodos usados para la obtención de proteínas totales, las soluciones amortiguadoras de lisis se complementaron con inhibidores de fosfatasa: Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, México) 2 mM y NaF (Sigma-Aldrich, Mexico) 1 mM.

### **18) Inmuno-detección (Western blot).**

Se probaron diferentes parámetros para poder estandarizar el método de detección de esta proteína en las células de insectos: Entre estos se analizaron: la cantidad de proteína utilizada en el gel (de 5 µg a 30 µg), las concentraciones y la naturaleza de los diferentes anticuerpos primarios (policlonal vs monoclonal; de 1:100 hasta 1: 100,000), los tiempos de incubación con los anticuerpos (de 30 min a 72 h).

El PBS (NaCl 8.5 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.38 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.02 g en un litro de agua a pH 7.2), es un buffer fisiológico hecho a base de fosfatos. Se utilizó como buffer en los ensayos de Western blot.

- a) Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE.
- b) Una vez distribuidas en el gel de acrilamida, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PVDF immobilon-P Milipore) durante 1h a 350 mA en una cámara húmeda (Hoefer Scientific Instruments), usando buffer de transferencia (20 % metanol en buffer Tris-Glicina 1X).
- c) La membrana se sacó del buffer de transferencia y se lavó en PBS 1X en agitación durante 5 min.
- d) La membrana se bloqueó durante 20 min con PBS 1X más Tween20 al 2%.
- e) Transcurrido el bloqueo se enjuagó con PBS 1X más Tween20 al 0.1% durante 10 s con agitación manual.
- f) La membrana se incubó con el anticuerpo primario (Tabla 4 M.M.) en solución con PBS 1X más Tween20 al 0.1% durante 1 h en agitación o toda la noche a 4°C.
- g) Al concluir la incubación con el primer anticuerpo, la membrana se lavó 10sg con agitación manual con PBS 1X más Tween20 al 0.1% 4 veces y durante 5 min en agitador 2 veces.
- h) El anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Tabla 4 M.M.) se adicionó en solución con PBS 1X más Tween20 al 0.1% durante 1 hora en agitación concentración 1:10,000.
- i) Al concluir la incubación con el segundo anticuerpo, la membrana se lavó 10sg con agitación manual con PBS 1X más Tween20 al 0.1% 4 veces y durante 5 min en agitador 2 veces con PBS 1X.
- j) Se adicionó 1 mL de solución de quimioluminiscencia (Pierce) por membrana, y se agitó un min.
- k) Se reveló la señal en cuarto oscuro en películas Kodak® X-Omat LS film.
- l) La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría (NHI-IMAGE, IMAGE J).

## **20) Electroforesis bidimensional (2D).**

### Isoelectroenfoque (primera dimensión).

Para el isoelectroenfoque de las proteínas se calcularon los microgramos de proteína total a cargar en función del tamaño de la tira según recomendación del fabricante (Dry strips (Amersham G.E. Healthcare Lifesciences).

El isoelectroenfoque para la estandarización de las muestras de intestino de mosquito, se realizaron en tiras de 13 cm con pH inmovilizado de 3-10 y 4-7. Se encontró que la mejor resolución de proteínas fue de 4-7, por tanto para el resto del trabajo se usó este rango de pH.

a) Para las tiras de 13 cm se mezclaron 100 µg de proteína total con 1µL de buffer IPG de pH inmovilizado de 4-7 (Amersham G.E. Healthcare) y el buffer de rehidratación (urea 7M, tiourea 2M, 2% CHAPS w/v, formalito 2% v/v, DTT 40 mM, 0.002% azul de bromofenol), para alcanzar el volumen final recomendado (200 µL).

b) La mezcla se colocó en el fondo del sarcófago de isoelectroenfoque (IEF), sobre la mezcla se puso la tira de acrilamida con pH inmovilizado (immobiline dry strip Amersham G.E. Healthcare Biosciences), con el lado con la malla de acrilamida en contacto con el buffer. Al momento de poner las tiras en el sarcófago se hicieron coincidir los electrodos (positivo con positivo y negativo con negativo).

- c) Finalmente la tira se cubrió con aceite mineral (Strip Cover Fluid Amersham G.E. Healthcare Biosciences), con la finalidad de evitar la evaporación de la muestra.
- d) Los sarcófagos se colocaron en la unida de isoelectrofoque Ettan IPGphor Isoelectric Focusing (Amersham G.E. Healthcare Biosciences), para iniciar el paso de rehidratación activa (16 h a 50  $\mu$ A/tira).
- e) Una vez transcurrido el tiempo de rehidratación, inició el programa de ciclos empleado para el isoelectroenfoco de las muestras protéicas en función de la longitud de la tira, y del rango de pH seleccionado (Tabla 6. M.M).

#### Equilibrio de la primera dimensión.

a) Al completarse los ciclos del IEF, las tiras se sacaron de los sarcófagos y fueron incubadas en agitación en el buffer de equilibrio BE (Tris/HCl pH 8.8 50 mM, Urea 6 M, Glicerol 30% v/v, SDS 2%, Azul de bromofenol 0.002%) suplementado con DTT (50 mg/5 mL de BE es suficiente para cubrir una tira) durante 15 min.

Tabla 6 M.M. Programación de la primera dimensión en el IPG.phore

Longitud tira	Rango de pH	Voltage (v)	Duración h:min	Volt-hora kWh
7 cm	3-10, 3-10 No lineal,4-7	<u>1 step and hold 500 V</u>	<u>0:30</u>	<u>0.25</u>
		<u>2 step and hold 1000 V</u>	<u>0:30</u>	<u>0.5</u>
		<u>3 step and hold 5000 V</u>	<u>1:40</u>	<u>7.5</u>
		<u>Total</u>	<u>2:40</u>	<u>8.0</u>
11 cm	3-10,4-7	<u>1 step and hold 500 V</u>	<u>1:00</u>	<u>0.5</u>
		<u>2 step and hold 1000 V</u>	<u>1:00</u>	<u>1.0</u>
		<u>3 step and hold 8000 V</u>	<u>1:50</u>	<u>12.5</u>
		<u>Total</u>	<u>3:50</u>	<u>14.0</u>
18 cm	3-10, 3-10 No lineal,4-7	<u>1 step and hold 500 V</u>	<u>1:00</u>	<u>0.5</u>
		<u>2 step and hold 1000 V</u>	<u>1:00</u>	<u>1.0</u>
		<u>3 step and hold 8000 V</u>	<u>4:00</u>	<u>30.5</u>
		<u>Total</u>	<u>6:00</u>	<u>32.0</u>
24 cm	3-10, 3-10 No lineal,4-7	<u>1 step and hold 500 V</u>	<u>1:00</u>	<u>0.5</u>
		<u>2 step and hold 1000 V</u>	<u>1:00</u>	<u>1.0</u>
		<u>3 step and hold 5000 V</u>	<u>8:20</u>	<u>94.5</u>
		<u>Total</u>	<u>10:20</u>	<u>96.0</u>

b) Al terminar este periodo se incuban las tiras en buffer de equilibrio adicionado con iodoacetamida (125 mg/5 mL de BE ) durante 15 min.

## Segunda dimensión.

La separación de las proteínas por peso molecular se hizo en SDS PAGE. Se probaron varios porcentajes de poliacrilamida y un gel de poliacrilamida en gradiente, la concentración que resolvió mejor la mezcla protéica de intestino de mosco fue la concentración 15% de acrilamida.

- a) Se quitó el exceso de BE y iodoacetamida de las tiras sumergiéndolas en buffer de corrida (Tris base 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0.1% w/v).
- b) La tira se colocó de manera convencional con el lado positivo hacia la izquierda (junto al marcador de peso molecular) y con la malla de acrilamida hacia el frente.
- c) La electroforesis se realizó a 15 mA/gel durante toda la noche a 15° C.
- d) Se tiñó con cualquiera de las técnicas descritas en la sección de tinción.

## **22) Análisis de expresión diferencial de proteínas en geles bidimensionales (DIGE, "Differential in Gel Electrophoresis").**

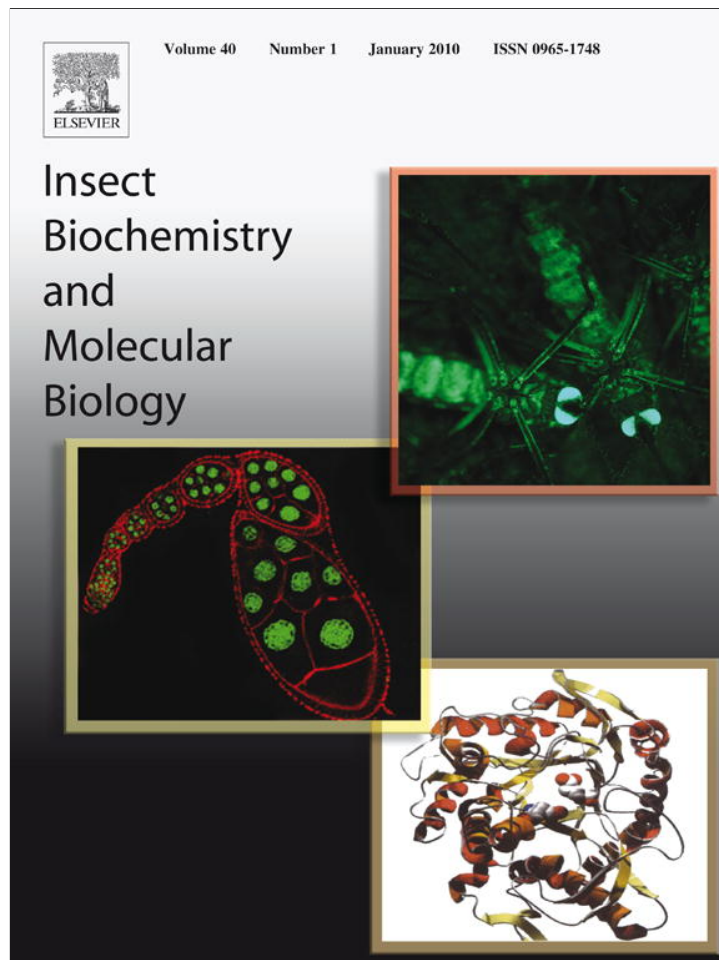
El sistema DIGE integra las tecnologías de fluorescencia, de electroforésis simultánea de muestras y de análisis de imágenes, el diagrama de flujo de la técnica se muestra en la figura 1 M.M.

Se usaron los fluoróforos CyDyes de Amersham G.E. Healthcare (CyDye2, CyDye3 y CyDye5) para premarcar las proteínas (marcaje mínimo) y hacerlas factibles de análisis en el mismo gel bidimensional (hasta 3 distintas muestras). Por convención el fluoróforo CyDye2 se usó para marcar el estándar interno (la mezcla representativa de todas las muestras del experimento en cantidades iguales que hace posible la comparación entre cada gel 2-D en el que haya sido incorporada. El diseño experimental incluyó 3 muestras (proteínas totales aisladas de los intestinos de larvas de 4o instar de *Ae. aegypti* pre tratadas con la CL designada de Cry11Aa, (CL<sub>10</sub> o CL<sub>50</sub> dependiendo del diseño experimental) la concentración equivalente de Cry1Ab, y sólo Buffer), en 6 réplicas (marcados con CyDye3 y con CyDye5 aleatoriamente para evitar el sesgo experimental) con el objetivo de tener valores estadísticos más confiables (Tabla 5 M.M.)

- a) Una vez que la proteína se procesa por 2-D Clean (Amersham G.E. Healthcare) según recomendaciones del fabricante, se ajustó el pH a 8.5 con NaOH para que la marca fluorescente se incorpore.
- b) Posteriormente fue cuantificada por 2-D Quant (Amersham G.E. Healthcare) según indicaciones del fabricante y se hicieron los cálculos para tener 100 µg de proteína por muestra (50 µg para marcar con el CyDye2 del estándar interno y 50 µg para marcar la proteína para el análisis).
- c) Los CyDyes se descongelaron a temperatura ambiente para añadir N,N-dimetil formamida (DMF) y rendir una solución stock 1 mM por cada CyDyes.
- d) La mezcla se agitó con vortex durante 30 seg y se centrifugó a 17,900 x g durante 30n seg.
- e) Se añadió 1µl (400pmoles) de CyDyes diluido por cada muestra de 50 µg de proteína, se mezclaron, se centrifugaron rápidamente y se dejaron en obscuridad y en hielo durante 30min.

- f) Para detener la reacción de marcaje se añadió un 1µl de Lisina 10 mM y se resuspendió con pipeta, se centrifugó brevemente y se incubo en hielo y en la oscuridad.
- g) Una vez marcadas las proteínas se agregó el buffer de hidratación y se continuó el protocolo marcado para primera dimensión (Tabla 6 M.M.) y segunda dimensión en la cámara de electroforesis PROTEAN Plus Dodeca cell for the second dimension (Biorad), tal como se describió previamente.
- h) Una vez concluida la electroforesis bidimensional, los geles con los marcajes fluorescentes fueron escaneados según condiciones señaladas para el escaner Typhoon de Amersham G.E. Healthcare.
- i) Las imágenes así obtenidas fueron analizadas para detectar las diferencias significativas en la expresión protéica entre las muestras biológicas expuestas a distintos tratamientos por el software DeCyder (Amersham G.E. Healthcare).
- j) Los spots marcados como diferenciales por el programa DeCyder fueron recuperados del gel con el Spot Picker (Amersham G.E. Healthcare).
- k) La identificación de péptidos se hizo por espectrometría de masas en la Universidad de Georgia Core Facility, E.U.

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>





Contents lists available at ScienceDirect

## Insect Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ibmb](http://www.elsevier.com/locate/ibmb)

## The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*

Angeles Cancino-Rodezno<sup>a</sup>, Cynthia Alexander<sup>a</sup>, Roberto Villaseñor<sup>a</sup>, Sabino Pacheco<sup>a</sup>, Helena Porta<sup>a</sup>, Yannick Pauchet<sup>b</sup>, Mario Soberón<sup>a</sup>, Sarjeet S. Gill<sup>c</sup>, Alejandra Bravo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca 62250, Morelos, Mexico

<sup>b</sup>Centre for Ecology and Conservation, School of Biosciences, University of Exeter, Cornwall campus, Penryn TR10 9EZ, UK

<sup>c</sup>Department of Cell Biology and Neuroscience, University of California, Riverside, CA 92506, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 23 October 2009

Received in revised form

10 December 2009

Accepted 19 December 2009

## Keywords:

*Bacillus thuringiensis*

Cry toxins

Defense responses

Mitogen-activated protein kinase p38

RNAi

*Aedes aegypti**Manduca sexta*

## ABSTRACT

The insecticidal Cry toxins are pore-forming toxins produced by the bacteria *Bacillus thuringiensis* that disrupt insect-midgut cells. In this work we analyzed the response of two different insect orders, the Lepidopteran *Manduca sexta* and Dipteran *Aedes aegypti* to highly specific Cry toxins, Cry1Ab and Cry11Aa, respectively. One pathway activated in different organisms in response to a variety of pore-forming toxins is the mitogen-activated protein kinase p38 pathway (MAPK p38) that activates a complex defense response. We analyzed the MAPK p38 activation by immunodetection of its phosphorylated isoform, and the induction of p38 by RT-PCR, real-time PCR quantitative assays and immunodetection. We show that MAPK p38 is activated at postraductional level after Cry toxin intoxication in both insect orders. We detected the p38 induction at the transcriptional and traductional level, and observed a different response. In these three levels, we found that both insects respond to Cry toxin action but *M. sexta* responds more strongly than *A. aegypti*. Gene silencing of MAPK p38 *in vivo*, resulted in both insect species becoming hypersensitive to Cry toxin action, suggesting that the MAPK p38 pathway is involved in insect defense against Bt Cry toxins. This finding may have biotechnological applications for enhancing the activity of some Bt Cry toxins against specific insect pests.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Pore-forming toxins (PFT) are important virulent factors produced by several pathogenic bacteria. Attack by PFT represents a fundamental threat to the host after infection and consequently general host defense responses have evolved against PFT. Among them, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) p38 pathway has been recognized as an important player, triggering survival responses in several cell types after treatment with different PFT. MAPK p38 activation after treatment with Cry (a PFT) was first described in *Caenorhabditis elegans* treated with the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry5B toxin (Huffman et al., 2004). Several works in other studied mammalian models showed that other PFT such as aerolysin (Huffman et al., 2004), pneumolysin (PLY), streptolysin

**Abbreviations:** PFT, Pore-forming toxins; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PLY, pneumolysin; SLO, streptolysin O; Hla,  $\alpha$ -hemolysin; UPR, endoplasmic reticulum stress response to unfolded proteins; LLO, listeriolysin; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor; LC<sub>50</sub>, 50% lethal concentration; RNAi, RNA interference.

\* Corresponding author. Tel.: +52 7773291635; fax: +52 7773291624.

E-mail address: [bravo@ibt.unam.mx](mailto:bravo@ibt.unam.mx) (A. Bravo).

0965-1748/\$ – see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.ibmb.2009.12.010

O (SLO),  $\alpha$ -hemolysin (Hla), and anthrolysin O produced by different bacteria, when assayed at low doses in cultured-epithelial cell lines induced the activation of MAPK p38 pathway (Ratner et al., 2006). The pore-formation activity of PFT seems to play an important role since toxin deficient mutants or single-point mutations in toxin regions essential for pore-formation activity were unable to induce the MAPK p38 response, suggesting that the observed phosphorylation of MAPK p38 protein correlated with formation of – at least – few pores in the membrane (Ratner et al., 2006). Recently, it was shown that loss of K<sup>+</sup> ions is likely involved in inducing activation of MAPK p38 as a response to  $\alpha$ -toxin, *Vibrio cholera* cytotoxin (VCC), SLO or *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) (Kloft et al., 2009).

Regarding downstream responses induced after activation of MAPK p38, it was described that one of the targets of MAPK p38 in the nematode *C. elegans* was *ttm-1* gene, an orthologue of a human divalent cation transporter, suggesting that up regulation of an efflux transporter may be important in removing cytotoxic cations from the cytosol (Huffman et al., 2004). Later, it was shown that the endoplasmic reticulum stress response to unfolded proteins (UPR) was also induced in *C. elegans* and in HeLa cells, as a downstream

response induced after activation of MAPK p38 by two different PFT. This pathway protects cells from accumulation of unfolded proteins and increases phospholipid biogenesis to defend cells against these toxins (Bischof et al., 2008). In mast-cells, low doses of SLO or listeriolysin (LLO) activates the MAPK p38 pathway resulting in up regulation of cytokines mRNA expression such as tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ). This cytokine plays an important role in host defense in the murine model, recruiting inflammatory cells critical for innate and adaptive immunity (Gekara et al., 2007; Stassen et al., 2003).

Most of these studies were done in cultured cells not in complete animals, the only exception being studies performed with *C. elegans*. In insects, the responses to PFT Cry toxins produced by *B. thuringiensis* and specifically the participation of MAPK p38 pathway during Cry toxin intoxication have not been described. The mechanism of action of Cry1A toxins in insect larvae involves sequential interaction with several receptors, toxin oligomerization and pore formation in the apical membrane of larval midgut cells causing osmotic shock, cell lysis and insect death (Bravo et al., 2004, 2007). Since it was shown that Cry5B toxin induced a defense response in the nematode *C. elegans* (Huffman et al., 2004), we hypothesized that other Cry toxins may induce a similar response in insects. Therefore, we analyzed the response of two different insect orders, *Manduca sexta* as a model of Lepidopteran insects and *Aedes aegypti* as a model of Dipteran insects, after intoxication with specific Cry toxins. We set up conditions for an effective RNA interference analysis by feeding dsRNA to larvae and demonstrated that the MAPK p38 pathway plays a protective role *in vivo* against Cry toxins action in both insect orders.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cry toxin purification

Bt strains harboring pHT315-Cry1Ab [8] or pCG6-Cry11Aa (Chang et al., 1993; Wu et al., 1994) plasmids were grown at 30 °C in nutrient broth sporulation medium with 10  $\mu$ g/ml erythromycin until complete sporulation (Meza et al., 1996). Crystal inclusions were observed under phase contrast microscopy and purified by sucrose gradients (Thomas and Ellar, 1983). As control we used Cry1Ab-R99E (Jiménez-Juárez et al., 2007) and Cry11Aa-R90E (Muñoz-Garay et al., 2009), two different helix  $\alpha$ -3 point mutants that were non-toxic to their corresponding insect-targets and were reported to be affected in oligomerization and pore-formation activity.

### 2.2. Bioassays

For bioassays using *M. sexta* larvae spore-crystals suspensions of wild type and mutant Cry1Ab (from 0 to 2000 ng/cm<sup>2</sup>) were applied onto the diet surface in 24-well plates as described (Gómez et al., 2002). For clarity each well in the plate has a surface of 2 cm<sup>2</sup>, we applied a volume of 35  $\mu$ l per well containing the different toxin concentrations and wait until the surface is complete dry, then one larva was added per well and 24 larvae per dose. Mortality was recorded after seven days and lethal concentration (LC<sub>50</sub>) estimated by Probit analysis (Polo-PC LeOra Software). Protein concentration of spore-crystal preparation was determined by the Bradford assay. For bioassays using *A. aegypti* larvae wild type and mutant Cry11Aa spore-crystal suspensions (from 0 to 10,000 ng/ml) were directly added to 100 ml H<sub>2</sub>O. Ten fourth instar larvae were added. Mortality was recorded after 24 h and LC<sub>50</sub> values and protein concentration were determined as above.

For insect intoxication assays we used second instar *M. sexta* larvae fed with different concentrations (from 0 to 20 ng/cm<sup>2</sup>) of

Cry1Ab crystal-spore suspension for different times (from 30 min to 7 days). For *A. aegypti* experiments, 4th instar larvae were fed with 0–2500 ng/ml Cry11Aa crystal-spore suspension during different times (from 30 min to 24 h). Larval midguts were dissected from survivors to obtain total RNA and protein samples for RT-PCR or Western blot assays, respectively.

### 2.3. Western blot assays

Total protein samples were prepared from isolated *M. sexta* midguts. Midguts were homogenized in CellLytic M Cell Lysis reagent (Sigma) supplemented with protease inhibitors (Complete; Roche) and 1 mM NaVo, 20 mM NaF phosphatase inhibitors (Sigma) at 4 °C. Total protein extracts from *A. aegypti* midguts were suspended and homogenized in lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 40 mM DTT) supplemented with protease complete inhibitors and phosphatase inhibitors as described above at 4 °C. 20  $\mu$ g of protein sample from *M. sexta* or 25  $\mu$ g of protein sample from *A. aegypti* larvae were boiled 5 min in Laemmli sample loading buffer, separated in SDS-PAGE and electrotransferred onto a nitrocellulose membrane. The proteins were detected by Western blot using commercial antibodies: monoclonal antibody M8432 to non activated MAPK p38 (dilution 1:15,000) (Sigma); monoclonal antibody M8177 to activated p38 MAPK (phosphorylated) (dilution 1:5000) (Sigma); anti phosphorylated p38 MAPK (Thr180/Tyr 182) antibody 9215 (Dilution 1:500) (Cell Signaling); mouse anti-tubulin 180092 antibody (dilution 1:3000) (Zymed). HRP-coupled rabbit anti-mouse IgG (dilution 1:15,000) (Zymed) or goat anti-rabbit IgG (dilution 1:10,000) (Invitrogen) were used as secondary antibodies. Results are representative experiments of three repetitions. Blots were revealed with luminol (ECL; Amersham Pharmacia Biotech) as described by the manufacturers. Molecular weight markers used in all SDS-PAGE were precision pre-stained plus standards all blue (BioRad, Hercules CA).

### 2.4. RT-PCR and real-time PCR

Total RNA was isolated using the RNeasy Kit (Qiagen). One microgram of total RNA was used for RT-PCR amplification using a First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV, Roche). Specific oligonucleotides (Table 1) were designed to amplify *M. sexta* MAPK p38 (Ms-p38-F and Ms-p38-R) based on larval midgut ESTs generated using 454 pyro-sequencing (Pauchet et al., 2009). Specific oligonucleotides for MAPK p38 from *A. aegypti* (Ae-p38-F and Ae-p38-R) were designed based on the genome sequence accession number AAEL008379. Actin and RPS3 genes from *M. sexta* (accession numbers L13764 and U12708, respectively) were amplified as controls using Ms-actin and Ms-RPS3 primers described in Table 1. Four replicates were performed with independent biological samples. Real-time PCR was performed by Eurofins MWG GmbH Germany, on an ABI 7000 Instrument using Amplifluor Detection System (Serologicals, Clarkston, GA). *M. sexta*

**Table 1**  
Sequences of oligonucleotides used for transcript amplification.

	Oligonucleotide sequence
Ms-p38-F	5' CCC AAG CTT CGG CCA TAG ACA CTT TGC ATA ATA TG
Ms-p38-R	5' CCG GAA TTC CCG ATT ACA TTT TCA TGG TTC
Ae-p38-F	5' GAA GAT CTT CGG AAA TCA TGC TCA ACT
Ae-p38-R	5' GAA GAT CTT CGG GAC GAA ATT AAG TAC
Ms-actin-F	5' GTC GAC AAT GGC TCC GGC ATG TGC A
Ms-actin-R	5' TCT GGG TCA TCT TTT CCC TGT TGG CCT TGG GGT
Ms-RPS3-F	5' CCG ATC GGA GAT CAT CAT CAT GGC C
Ms-RPS3-R	5' CAT CCG CGA GTT GAC TTC GGT CGTC

were fed 2.5 ng/cm<sup>2</sup> toxin during different times from 30 min to 7 days. Actin and RPS3 were used as real-time PCR normalization controls. Quadruplicate rounds of quantitative real-time PCR were performed.

### 2.5. RNA interference (RNAi) assays

MAPK p38 cDNA fragments were amplified from *M. sexta* and *A. aegypti* as stated above and cloned into a TOPO cloning vector using TOPO TA cloning kit (Invitrogen) and subcloned into pLitmus28i vector (HiScribe™, New England Biolabs, Beverly, MA) containing two T7 promoters flanking the multi-cloning site. These promoters enabled amplification of the cloned fragment by using a T7 oligonucleotide. The PCR product was purified with QIAquick PCR purification kit (Qiagen Valencia, CA). *In vitro* transcription of both DNA strands of the insert was performed with T7 RNA polymerase using the HiScribe RNAi Transcription Kit (New England Biolabs) as reported by the manufacturer, yielding dsRNA.

One hundred *M. sexta* neonates were fed with a single dose of 1 µl drop per larvae containing 5 µg Ms-p38 dsRNA. Each neonate *M. sexta* was located just in front of the drop. We were careful to observe that each larva ingested the µl drop, and then they were transferred to artificial diet until they reached third instar for midgut dissection.

For gene silencing in *A. aegypti*, 200 neonates were fed for 16 h with 200 µg of dsRNA previously encapsulated in Effectene transfection reagent (Qiagen). For encapsulating the dsRNA in Effectene, 200 µg of dsRNA in a final volume of 4 ml of DNA-condensation buffer (EC buffer Qiagen), were mixed with 0.8 ml of Enhancer buffer (Qiagen) by vortexing and incubated 5 min at room temperature. Then the sample was mixed with 1.3 ml of Effectene by vortexing and incubated 10 min at room temperature. This sample was diluted in dechlorinated water to a final volume of 10 ml where 200 larvae were added and incubated for 16 h. After dsRNA feeding, the mosquito larvae were transferred to clean water and fed with regular diet, ground brewers yeast, lactalbumin and rat food Chow (1:1:1 ratio) (Bayyareddy et al., 2009) daily, until they reached fourth instar when bioassays were performed or guts were dissected for analysis by RT-PCR and Western blot. The Effectene-liposomes may be slightly toxic since feeding *A. aegypti* larvae with Effectene-liposomes causes mortality depending on time of exposure and concentration. In the conditions described here, RNA-free Effectene-liposomes caused 5% mortality.

## 3. Results

To evaluate the consequence of PFT action on insect larvae we analyzed the effect of two different Cry toxins that are specifically active against two different insect orders. Cry1Ab toxin is highly active against larvae of the lepidopteran *M. sexta*, while Cry11Aa toxin is active against dipteran *A. aegypti* larvae. Using a dose-dependent toxicity assay, a lethal concentration at which 50% of the larvae die (LC<sub>50</sub>) was obtained for both insect models. Cry1Ab bioassays were performed using *M. sexta* neonates by applying various concentration of the spore-crystal preparation at the surface of artificial diet, and mortality was recorded after seven days of toxin exposure. For Cry11Aa bioassays, fourth instar *A. aegypti* larvae were exposed to various concentrations of spore-crystal sample in dechlorinated water and mortality was recorded after 24 h of toxin exposure (Mulla et al., 1985; Pérez et al., 2005). As controls we included spore-crystal samples containing two non-toxic mutants, Cry1Ab-R99E for *M. sexta*, and Cry11Aa-R90E for *A. aegypti*. These two mutants are unable to oligomerize properly which affects their pore-formation activity (Jiménez-Juárez et al., 2007; Muñoz-Garay et al., 2009). The LC<sub>50</sub> values obtained for

spore-crystal samples of both wild type and mutant toxins on their corresponding target insect are summarized in Table 2.

### 3.1. Activation of MAPK p38 pathway in insects after intoxication with Cry toxins

We decided to investigate the activation of MAPK p38 pathway by analyzing the induction of MAPK p38 protein phosphorylation by Cry toxins. Phosphorylation of MAPK p38 was analyzed by Western blot experiments using an anti-p38 antibody that specifically recognizes the phosphorylated isoform of MAPK p38. In *M. sexta* larvae, phosphorylation of MAPK p38 was observed at short time incubation, we fed the larvae during 30 min with spore-crystal suspension at LC<sub>50</sub> and observed that the phosphorylation of this protein increased even more after 1 h of treatment (Fig. 1A). Phosphorylation of MAPK p38, in *M. sexta*, is dose-dependent since one-hour treatment with 2 ng of Cry1Ab spore-crystal per cm<sup>2</sup>, corresponding to the LC<sub>50</sub>, resulted in a lower activation than a treatment with 20 ng of Cry1Ab spore-crystal per cm<sup>2</sup>. A treatment of 1 h with the spore-crystal suspension of non-active mutant Cry1Ab-R99E did not induce any activation of MAPK p38 protein (Fig. 1A), suggesting that phosphorylation of MAPK p38 is an *in vivo* response of larval midgut cells to intoxication by Cry1Ab toxin. Similar results were observed in *A. aegypti* larvae (Fig. 1B). Phosphorylation of MAPK p38 was observed after 30 min treatment with Cry11Aa and increased further after 1 h of toxin ingestion (LC<sub>50</sub>). In comparison, no activation of MAPK p38 was observed when mosquito larvae were fed the spore-crystal suspension of the non-toxic Cry11Aa-R90E mutant (Fig. 1B).

In order to determine the effect of Cry toxins on MAPK p38 expression in both insects, the p38 protein level was analyzed by Western blot using an anti-p38 antibody after long time of intoxication with the spore-crystal suspensions. In *M. sexta* larvae, we observed an increase in MAPK p38 protein level after seven days of spore-crystal exposure, with LC<sub>50</sub>. If the larvae were fed with a higher dose of spore-crystal corresponding to LC<sub>90</sub> concentration, the amount of MAPK p38 was higher than the control without toxin but lower than the LC<sub>50</sub> dose; this is probably due to the fact that LC<sub>90</sub> is a high dose where most of the larvae are death after seven days. (Fig. 2A). Similarly, RT-PCR analysis showed a clear induction by Cry1Ab of MAPK p38 transcript level detected after 24 h and up to seven days when larvae were fed with a dose of LC<sub>50</sub> (Fig. 2B). The mRNA levels of MAPK p38 in *M. sexta* larvae were low without induction with Cry1Ab toxin (see control lane in Fig. 2B) only after 24 h there is a clear increase in RNA levels. These data were confirmed by quantitative real-time PCR experiments, indicating that MAPK p38 transcript level increases 0.53, 1.83, 3.08 and 7.42 fold after 30 min, 24 h, 48 h and seven days respectively (Fig. 2C).

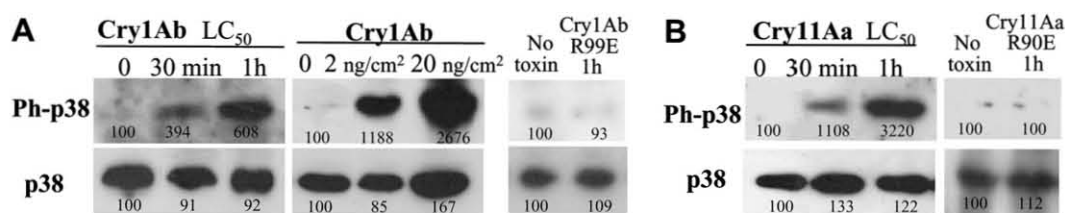
**Table 2**  
Toxicity of spore-crystal suspensions of wild type and mutated Cry toxins against *Manduca sexta* and *Aedes aegypti* larvae.

δ-endotoxin	Insect	LC <sub>50</sub> (95% fiducial limits)	Slope (error value)	Fold increase in susceptibility
Cry1Ab	<i>M. sexta</i>	2 (0.8–4) <sup>a</sup>	2.5 (0.5)	1
Cry1Ab	p38-silenced <i>M. sexta</i>	0.25 (0.15–0.4) <sup>a</sup>	1.8 (0.3)	8
Cry1Ab-R99E	<i>M. sexta</i>	>2000 <sup>a</sup>	ND <sup>c</sup>	ND
Cry11Aa-R90E	<i>A. aegypti</i>	>10,000 <sup>b</sup>	ND	ND
Cry11Aa + Effectene	<i>A. aegypti</i>	30 (25–36) <sup>b</sup>	5.0 (0.5)	1
Cry11Aa + Effectene	p38-silenced <i>A. aegypti</i>	3 (2–4) <sup>b</sup>	4.2 (0.4)	10

<sup>a</sup> LC<sub>50</sub> ng/cm<sup>2</sup>.

<sup>b</sup> LC<sub>50</sub> ng/ml.

<sup>c</sup> Not determined.



**Fig. 1.** Phosphorylation of MAPK p38 in insects after intoxication with Cry toxins. Panel A, first instar *Manduca sexta* larvae were intoxicated with 2 ng/cm<sup>2</sup> (LC<sub>50</sub>) or 20 ng/cm<sup>2</sup> Cry1Ab for up to 1 h. *M. sexta* larvae were also treated 1 h with the non-toxic mutant Cry1Ab-R99E affected in oligomerization and pore formation. Panel B, fourth instar *Aedes aegypti* larvae were fed an LC<sub>50</sub> of Cry11Aa toxin or the non-active mutant Cry11Aa-R90E. The presence of phosphorylated and total MAPK p38 proteins was analyzed by western blot using specific antibodies. The blots presented here are representative figures of three independent experiments. Numbers under the blots are percentage in relation to the control band (no toxin or time 0, which was considered as 100%), after scanning the bands. Ph-p38, phosphorylated MAPK p38; p38, total MAPK p38.

In contrast, very small or no changes in protein or transcript levels were observed for MAPK p38 in *A. aegypti* larvae exposed to Cry11Aa toxin (Fig. 2A and B).

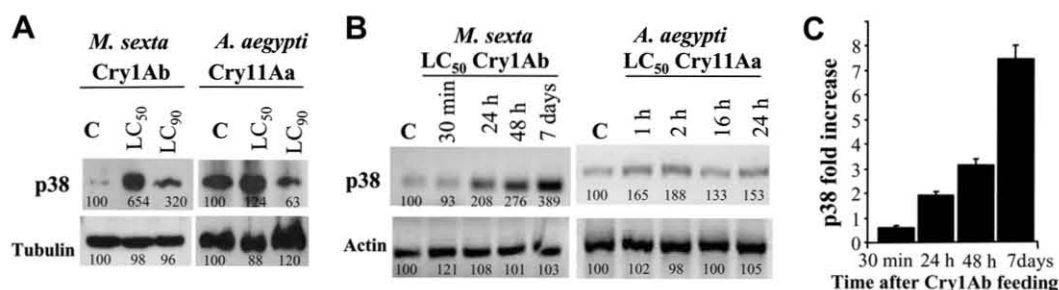
### 3.2. Silencing of MAPK p38 by RNAi in *M. sexta* and *A. aegypti*

In order to determine the role of MAPK p38 pathway in protection against Cry toxins in both insect orders, we set up conditions for silencing by RNAi their corresponding MAPK p38 transcript. Previously, we demonstrated that injecting dsRNA into *M. sexta* larvae resulted in specific silencing of the Cry1Ab cadherin receptor (Soberón et al., 2007). However, it was recently reported that RNAi was efficiently induced in both Lepidopteran and Coleopteran insect orders by delivering dsRNA by feeding (Baum et al., 2007; Mao et al., 2007). In this work we set up the conditions to efficiently deliver dsRNA by feeding both *M. sexta* and *A. aegypti* larvae (Materials and methods). In the case of *M. sexta*, dsRNA was offered to starved and water deprived neonates and after eating the dsRNA, these exposed larvae were returned to artificial diet until they reached third instar. The MAPK p38 transcript and protein levels were then determined in third instar *M. sexta* larvae by RT-PCR and Western blot (Fig. 3). The *M. sexta* larvae that were fed with p38-dsRNA showed undetectable levels of MAPK p38 protein and transcript in contrast with larvae fed with water with an 80% silencing efficiency (Fig. 3). As a control we analyzed expression of tubulin protein and actin and RPS3 transcripts that remained unchanged after MAPK p38 dsRNA feeding. In *A. aegypti* larvae, the silencing of gene expression by RNAi was not a straightforward process, since mosquito larvae are filter-feeding insects. Therefore, we fed the larvae either with high amounts of

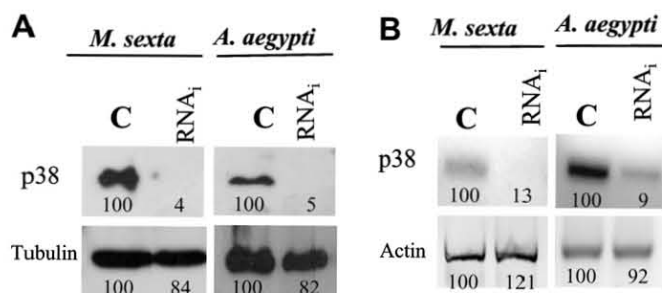
dsRNA directly added to a small volume of water, or with transformed *E. coli* bacteria that were activated for expression of the dsRNA. None of these treatments resulted in any silencing of the MAPK p38 gene (data not shown). Finally we fed first instar larvae with MAPK p38-dsRNA encapsulated in Effectene-liposomes (see Materials and methods). After feeding the mosquito larvae with Effectene-liposome encapsulated dsRNA, larvae were transferred to clean water with regular diet until they reached fourth instar where MAPK p38 protein and RNA levels were analyzed by Western blot and RT-PCR respectively. Similarly as in lepidopteran *M. sexta*, the MAPK p38 transcript and MAPK p38 protein were down regulated in contrast to tubulin protein and to actin transcript that were not modified by MAPK p38-dsRNA treatment (Fig. 3).

### 3.3. Role of MAPK p38 response in defense mechanisms of *M. sexta* and *A. aegypti* against Cry toxins

Finally, to determine the effect of silencing of MAPK p38 on Cry toxin susceptibility in both insect species, we analyzed the insecticidal activity of Cry1Ab and Cry11Aa spore-crystal suspension in MAPK p38-silenced and in control larvae. Both *M. sexta* and *A. aegypti* p38-silenced larvae became hypersensitive to the insecticidal action of Cry toxins (Table 2). For the p38-silenced *M. sexta* larvae, we assayed a range of Cry1Ab spore-crystal concentrations that range from 0 to 10 ng/cm<sup>2</sup> of diet. We observed an 8 fold decrease of the LC<sub>50</sub> of the *M. sexta* silenced larvae when compared with the normal *M. sexta* larvae, indicating higher susceptibility to the toxin. In *A. aegypti* larvae, RNA-free Effectene-liposomes caused a decrease of the Cry11Aa LC<sub>50</sub> in compared to untreated larvae. However, when MAPK p38-silenced *A. aegypti*



**Fig. 2.** Activation of MAPK p38 protein synthesis in insects after intoxication with Cry toxins. Panel A, Analysis of the MAPK p38 protein levels in *Manduca sexta* or in *Aedes aegypti* larvae by Western blot experiments using an anti-p38 antibody at various times after intoxication. First instar *M. sexta* larvae were treated with LC<sub>50</sub> or LC<sub>90</sub> Cry1Ab toxin concentrations and analyzed after seven days of intoxication. Fourth instar *A. aegypti* larvae were also treated with corresponding LC<sub>50</sub> or LC<sub>90</sub> Cry11Aa toxin concentrations and analyzed after 24 h. Detection of tubulin protein was determined as control protein. The blots presented here are representative figures of three independent experiments. Numbers under the blots are percentage in relation to the control band, after scanning the bands. The control band corresponds to no toxin, which was labeled with a C and was considered as 100%. Panel B, Analysis of the expression of MAPK p38 RNA by RT-PCR assays in *M. sexta* or in *A. aegypti* after treatment with the corresponding Cry1Ab or Cry11Aa toxins at different times. Expression of actin gene was used as control in these assays. The results presented here are representative figures of four independent experiments. Numbers under the bands are percentage in relation to the control band, after densitometry analysis. The control band corresponds to time 0, which was labeled with a C and was considered as 100%. Panel C, Regulation of MAPK p38 gene in *M. sexta* larvae after intoxication with LC<sub>50</sub> of Cry1Ab toxin analyzed by quantitative RT-PCR assays.



**Fig. 3.** Silencing of MAPK p38 by RNAi in *Manduca sexta* and *Aedes aegypti* larvae. MAPK p38 expression was silenced by feeding dsRNA to *M. sexta* and *A. aegypti* larvae. Panel A, The presence of total MAPK p38 protein was analyzed by western blot assays using specific antibodies. Panel B, The expression of MAPK p38 gene was analyzed by RT-PCR assays. Numbers under the bands are percentage in relation to the control band, after densitometry analysis. The control bands correspond to non-silenced larvae, which were labeled with a C and were considered as 100%.

larvae were tested for their susceptibility to Cry11Aa a 10-fold increase in susceptibility to the toxin, in comparison to larvae treated with RNA-free Effectene-liposomes, was observed (Table 2).

Therefore, our results suggest that the MAPK p38 pathway has a protective function against the PFT Cry1Ab and Cry11Aa toxins, in both lepidopteran and dipteran insects.

#### 4. Discussion

Understanding the mechanism of action of PFT as well as host responses to these toxins would provide ways to deal with different pathogens and to improve the action of toxins that have biotechnological applications. Eukaryotic cells have developed a variety of defense mechanisms against PFT. Epithelial cells have evolved cellular non-immune defense mechanisms to deal with membrane impairment in their membrane permeability, such as changes in osmotic pressure, ion composition and changes in intracellular calcium concentration induced by PFT (Aroian and van der Goot, 2007). One of these early responses involves activation of the MAPK p38 pathway. It was demonstrated that osmotic stress produced after formation of a few pores by different PFT in target cells, induces a MAPK p38-phosphorylation-response that is a crucial switch for a survival response (Huffman et al., 2004; Ratner et al., 2006; Bischof et al., 2008; Husmann et al., 2006; Aroian and van der Goot, 2007). However, most of these studies were done in cultured cells not in complete animals. The only exceptions were the reports done with the nematode *C. elegans*, intoxicated with Cry5B toxin. It is important to mention that the mechanism of action of Cry5B in the nematode is not completely understood and may have significant differences in relation of the mode of action of other Cry toxins that are specific against insects. The main difference is that protein receptors have not been described in nematodes and that pore-forming activity of Cry5B or oligomerization of this toxin has not been demonstrated. In this work we focused to analyze the cellular response regarding to MAPK p38 activation presented by two insect species after intoxication with specific insecticidal PFT such as the Bt Cry toxins.

Here we describe intracellular effects induced by Cry toxins in insects. We demonstrate that in two different insect orders MAPK p38 pathway was specifically activated at posttranslational level by phosphorylation when insect larvae were exposed to active Cry toxins at short times and that exposure to point-mutant toxins affected in oligomerization and pore formation were unable to induce this response. However, the induction response of MAPK p38 kinase in both insects differ since in *M. sexta* the transcript and protein levels were induced when larvae were exposed to Cry1Ab

toxin, but in *A. aegypti* larvae no induction of MAPK p38 transcript or protein levels were observed after exposure to Cry11Aa toxin.

To analyze the role of the MAPK p38 pathway as a response to insecticidal activity of Cry toxins the expression of MAPK p38 pathway was inhibited by dsRNA. Recently it was reported that delivering of dsRNA by feeding is an efficient way for specific gene silencing in lepidopteran (Mao et al., 2007) and coleopteran species (Baum et al., 2007). Also that transgenic plants expressing these dsRNA could be used in the control of insect pests (Baum et al., 2007). Here, we show that delivering dsRNA by feeding is also an efficient way for gene silencing in another insect order, the dipteran *A. aegypti* larvae. However effective silencing was only observed when dsRNA was previously encapsulated in liposomes. To our knowledge this is a novel method to silence genes in the larval stage of an important mosquito vector of human diseases. We also silenced expression of MAPK p38 in the lepidopteran *M. sexta* and demonstrated that in both insect species the MAPK p38 plays a central role in defense responses *in vivo* against Cry toxins, since elimination of MAPK p38 protein leads to hypersensitivity to the PFT Cry1Ab or Cry11Aa.

The MAPK p38 pathway is a highly conserved signaling module known to participate in stress responses. Therefore its down regulation may compromise the insects' ability to respond against environmental stress. In this work we show that insects become hypersensitive to Cry toxin action after silencing MAPK p38 expression. Pore formation induced by Cry toxins probably perturbs both ionic homeostasis and intracellular ATP pool. Therefore it is crucial that target cells possess mechanisms to heal membrane lesions in order to survive. It has been shown that aerolysin treatment of CHO cells results in the activation of the SREBP pathway (Gurcel et al., 2006). Also it was reported that MAPK p38 is involved in activation of the *ire-1-xbp-1* branch of the UPR pathway in HeLa cells after aerolysin treatment (Bischof et al., 2008). In both cases the final outcome is an increase in phospholipids biogenesis, suggesting that target cells may respond to PFT by increasing membrane biogenesis in order to repair the membrane lesions (Gurcel et al., 2006). Alternatively another way to repair cell surface lesions is their internalization into endosomes. Supporting this scenario, Husmann et al. (2008) reported that *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin is internalized by endocytosis during cell recovery. Also, Idone et al. (2008) showed that  $Ca^{+2}$  dependent endocytosis is involved in membrane resealing and cellular recovery after SLO exposure. Interestingly, it was shown that MAPK p38 could modulate endocytosis by regulation of Rab5 cycle and recruitment of its effectors (Cavalli et al., 2001; Mace et al., 2005). The role of endocytosis, SREBP and UPR responses in defense of Cry toxin intoxication in insects, as well as the role of genes that were induced during Cry toxin intoxication remains to be analyzed.

It is clear that eukaryotic cells may have multiple mechanisms to respond against different stress situations. Valaitis (2008) reported that in *Lymantria dispar* larvae the treatment with active Cry1A toxins induce shedding of two glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-anchored receptors (aminopeptidase N (APN) and alkaline phosphatase). It was proposed that receptor shedding might be a defense mechanism against Cry toxins, since ectodomains of receptors may function as competitive inhibitors preventing toxin interaction with cell surface receptors (Valaitis, 2008). The APN-shedding could be inhibited by different molecules such as cyclic AMP; inhibitors of the MEK/ERK pathway such as PD98059 and U1026; suramin, a broad-spectrum antagonist of cell surface receptors and piceatannol, a potent inhibitor of the Syk tyrosine kinase. However, inhibition of the shedding of GPI-anchored receptors by cAMP did not affect Cry1A toxicity (Valaitis, 2008), suggesting that shedding of APN may not be involved in the defense to Cry toxin action.

Finally, Loeb et al. (2001) reported that treatment of *Heliothis virescens* cultured midgut cells with low doses of Cry1Ac toxin stimulated the proliferation of stem cells and induced their differentiation. These data represent a complex response; since stem cell proliferation and differentiation is orchestrated by multiple feedback controls involving hormones, growth factors, smaller regulatory molecules and transcription factors. However, the role of MAPK p38 in this effect remains to be analyzed.

Our results show that insects respond to PFT by activation of the MAPK p38 transduction pathway that results in defense mechanism to Cry toxin action. Still remains to be determined the specific defense cellular responses induced by the MAPK p38 pathway. Proteomic analysis of cellular responses in silenced and non-silenced MAPK p38 larvae could reveal the proteins involved in defense to Cry toxins. However, our results show that it is possible to enhance Cry toxin action by inhibiting a specific signal transduction pathway. This may have biotechnological applications for enhancing the activity of some Bt Cry toxins against specific insect pests. Several insect pests are poorly controlled by Cry toxins and in these cases it may be feasible to enhance Cry toxin activity by feeding at the same time the specific MAPK p38 dsRNA and the Cry toxin by co-expressing both factors in the same transgenic plant.

## Acknowledgments

We thank Lizbeth Cabrera for technical assistance. This work was supported by grants from CONACyT U48631-Q; DGAPA-UNAM IN218608 and IN206209; and NIH 1R01 AI066014.

## References

- Aroian, R., van der Goot, F.G., 2007. Pore-forming toxins and cellular non-immune defenses (CNIDs). *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 57–61.
- Baum, J.A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G.R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Muniyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T., Roberts, J., 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 25, 1322–1326.
- Bayyareddy, K., Andacht, T.M., Abdullah, M.A., Adang, M.J., 2009. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 279–286.
- Bischof, L.J., Kao, C.Y., Los, F.C., Gonzalez, M.R., Shen, Z., Briggs, S.P., van der Goot, F.G., Aroian, R.V., 2008. Activation of the unfolded protein response is required for defenses against bacterial pore forming toxin in vivo. *PLoS Pathog.* 4, e1000176.
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S.S., Soberón, M., 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta* 1667, 38–46.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49, 423–435.
- Cavalli, V., Vilbois, F., Corti, M., Marcote, M.J., Tamura, K., Karin, M., Arkinstall, S., Gruenberg, J., 2001. The stress-induced MAP kinase p38 regulates endocytic trafficking via the GDI:Rab5 complex. *Mol. Cell* 7, 421–432.
- Chang, C., Yu, Y.M., Dai, S.M., Law, S.K., Gill, S.S., 1993. High-level *cryIVD* and *cytA* gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein and the co-expressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 815–821.
- Gekara, N.O., Westphal, K., Ma, B., Rohde, M., Groebe, L., Weiss, S., 2007. The multiple mechanisms of  $Ca^{2+}$  signalling by listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytolysin of *Listeria monocytogenes*. *Cell. Microbiol.* 9, 2008–2021.
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., Soberón, M., 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix  $\alpha$ -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* 513, 242–246.
- Gurcel, L., Abrami, L., Girardin, S., Tschopp, J., van der Goot, F.G., 2006. Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell* 126, 1135–1145.
- Huffman, D.L., Abrami, L., Sasik, R., Corbeil, J., van der Goot, G., Aroian, R.V., 2004. Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10995–11000.
- Husmann, M., Dersch, K., Bobkiewicz, W., Beckmann, E., Veerachato, G., Bhakdi, S., 2006. Differential role of p38 mitogen activated protein kinase for cellular recovery from attack by pore-forming *S. aureus*  $\alpha$ -toxin or streptolysin O. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344, 1128–1134.
- Husmann, M., Beckmann, E., Boller, K., Kloft, N., Tenzer, S., Bobkiewicz, W., Neukirch, C., Bayley, H., Bhakdi, S., 2008. Elimination of a bacterial pore-forming toxin by sequential endocytosis and exocytosis. *FEBS Lett.* 583, 337–344.
- Idone, V., Tam, C., Goss, J.W., Toomre, D., Pypaert, M., Andrews, N.W., 2008. Repair of injured plasma membrane by rapid  $Ca^{2+}$  dependent endocytosis. *J. Cell Biol.* 180, 905–914.
- Jiménez-Juárez, N., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Gill, S.S., Soberón, M., Bravo, A., 2007. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non toxic to *Manduca sexta* larvae. *J. Biol. Chem.* 282, 21222–21229.
- Kloft, N., Busch, T., Neukirch, C., Weis, S., Boukhallouk, F., Bobkiewicz, W., Cibis, I., Bhakdi, S., Husmann, M., 2009. Pore-forming toxins activate MAPK p38 by causing loss of cellular potassium. *BMC* 385, 503–506.
- Loeb, M.J., Martin, P.A.W., Narang, N., Hakim, R.S., Goto, S., Takeda, M., 2001. Control of life, death and differentiation in cultured midgut cells of the lepidopteran *Heliothis virescens*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Anim.* 37, 348–352.
- Mace, G., Miacznska, M., Zerial, M., Nebreda, A.R., 2005. Phosphorylation of EEA1 by p38 MAP kinase regulates  $\mu$  opioid receptor endocytosis. *EMBO J.* 24, 3235–3246.
- Mao, Y.B., Cai, W.J., Hong, G.J., Tao, X.J., Wang, L.J., Huang, Y.P., Chen, X.Y., 2007. Silencing a cotton bollworm monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance to gossypol. *Nat. Biotechnol.* 25, 1307–1313.
- Meza, R., Nuñez-Valdez, M.E., Sánchez, J., Bravo, A., 1996. Isolation of Cry1Ab protein mutants of *Bacillus thuringiensis* by a highly efficient PCR site-directed mutagenesis system. *FEMS Microbiol. Lett.* 145, 333–339.
- Mulla, M.S., Darwazeh, H.A., Ede, L., Kennedy, B., Dulmage, H.T., 1985. Efficacy and field evaluation of *Bacillus thuringiensis* (H-14) and *B. sphaericus* against floodwater mosquitoes in California. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 47, 3150–3155.
- Muñoz-Garay, C., Rodríguez-Almazán, C., Aguilar, J.N., Portugal, L., Gómez, I., Saab-Rinco, G., Soberón, M., Bravo, A., 2009. Oligomerization of Cry11Aa from *Bacillus thuringiensis* has an important role in toxicity against *Aedes aegypti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7548–7550.
- Pauchet, Y., Wilkinson, P., Vogel, H., Nelson, D.R., Reynolds, S.R., Heckel, D.G., Ffrench-Constant, R.H. Pyrosequencing the *Manduca sexta* larval midgut transcriptome: messages for digestion, detoxification and defence. *Insect Mol. Biol.* 2009 Nov 10. [Epub ahead of print]
- Pérez, C., Fernandez, L.E., Sun, J.W., Folch, J.L., Gill, S.S., Soberón, M., Bravo, A., 2005. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane bound receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18303–18308.
- Ratner, A.J., Hippe, K.R., Aguilar, J.L., Bender, M.H., Nelson, A.L., Weiser, J.N., 2006. Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins. *J. Biol. Chem.* 281, 12994–12998.
- Soberón, M., Pardo-López, L., López, I., Gómez, I., Tabashnik, B., Bravo, A., 2007. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science* 318, 1640–1642.
- Stassen, M., Muller, C., Richter, C., Neudorfl, C., Hultner, L., Bhakdi, S., Waley, I., Schmitt, E., 2003. The streptococcal exotoxin streptolysin O activates mast cells to produce tumor necrosis factor alpha by p38 mitogen-activated protein kinase- and protein kinase C-dependent pathways. *Infect. Immun.* 71, 6171–6177.
- Thomas, W.E., Ellar, D.J., 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell Sci.* 60, 181–197.
- Valaitis, A.P., 2008. *Bacillus thuringiensis* pore-forming toxins trigger massive shedding of GPI-anchored aminopeptidase N from gypsy moth midgut epithelial cells. *Insect Biochem. Mol. Chem.* 38, 611–618.
- Wu, D., Johnson, J.J., Federici, B.A., 1994. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIV proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Mol. Microbiol.* 13, 965–972.

# Defense and death responses to pore forming toxins

ANGELES CANCINO-RODEZNO, HELENA PORTA, MARIO SOBERÓN AND ALEJANDRA BRAVO\*

*Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap postal 510-3 CP 62250, Cuernavaca, Morelos, México.*

## Abstract

Pore forming toxins (PFT) are important virulence factors produced by bacteria to kill eukaryotic cells by forming holes in the cellular membrane. They represent a diverse group of proteins with a wide range of target cells. Although the amino acid sequence is not conserved among the different PFT, many of them share some aspects of their mechanism of action. In general, the mode of action of PFT involves receptor recognition, activation by proteases, and aggregation into oligomeric-structures that insert into the membrane to form ionic pores. Beside the pore formation activity, PFT may have other effects during its interaction with their target cells such as intra-cellular signaling or transport of other enzymatic components, as in the case of anthrax or diphtheria toxins produced by *Bacillus anthracis* and *Corynebacterium diphtheria*, respectively (Parker and Feil, 2005).

Although PFT have evolved as a pathogenic mechanism, some of them have great impact in society since they have different applications in biotechnology or are used as therapeutic agents, or as tools in the study of cell biology (Schiavo and van der Goot, 2001). On the other side, their target organisms have evolved different mechanisms

---

\* To whom correspondence may be addressed (bravo@ibt.unam.mx)

---

Abbreviations: PFT, Pore forming toxins; CDC, cholesterol dependent cytolysins; PA, anthrax protective antigen; MACPF, membrane-attack complex of complement and perforin; NLR, Nod-like receptors; MAPK, mitogen activated protein kinase; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor; PLY, pneumolysin; ILY, intermedilysin; LLO, listeriolysin; SLO, streptolysin O; HlyA,  $\alpha$ -hemolysin; PVL, Panton-Valentine leukocidin; Hla,  $\alpha$ -hemolysin; CPE, *Clostridium perfringens* enterotoxin; Bt-R<sub>1</sub>, *Manduca sexta* cadherin receptor for Cry1Ab; GPI, glycosyl phosphatidyl-inositol; RNAi, RNA interference; Akt, protein kinase B; UPR, endoplasmic reticulum stress response to unfolded proteins; CHO, Chinese hamster ovary cells; SREBP, sterol responsive element binding proteins; VCC, *Vibrio cholerae* cytolysin.

---

to counter toxin action. Understanding the mechanism of action of PFT as well as the host responses to toxin action would provide ways to deal with these pathogens or with emerging pathogens and more importantly to improve the action of toxins that have biotechnological applications. In this review we will describe the intracellular effects induced by some PFT and the cellular responses evolved by eukaryotic cell to overcome PFT action.

## Introduction

An essential feature of PFT is their capacity to interact with the target membrane and the conformational changes that lead to pore formation. In some sense PFT are unique proteins that are synthesized as soluble proteins that are capable of breaking the hydrophobic barrier of the cellular membrane becoming integral membrane-proteins. PFT are usually conformed by multiple domains. Some domains may have different and complementary functions as receptor binding, translocation, pore formation and other enzymatic activities such as ADP-ribosylating, metalloprotease or adenylate cyclase activities among others (Parker and Feil, 2005).

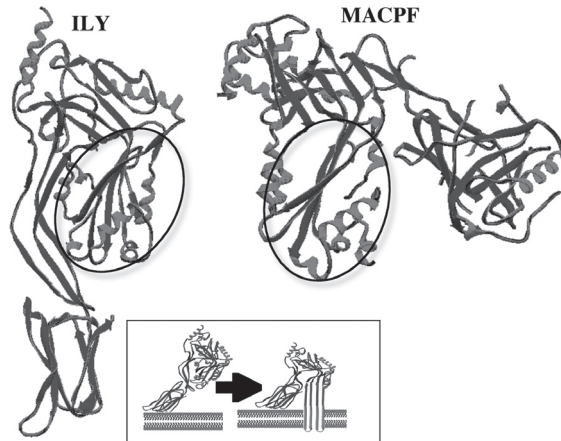
An initial step in pore formation includes interaction with the target-membrane, although the mechanism is unclear some generalities can be drawn, such as the presence of exposed aromatic residues that bind to the membrane bilayer as the cholesterol dependent cytolysins (CDC) produced by different genera of Gram-positive bacteria, including *Clostridium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Listeria* and *Arcanobacterium* (Palmer, 2001), or the presence of hydrophobic helical hairpins as the case of diphtheria toxin from *C. diphtheria* or colicins produced by some *Escherichia coli* strains (Parker and Feil, 2005).

Regarding membrane insertion, there are several examples of PFT that span the membrane bilayer by forming  $\beta$ -barrel structures, named  $\beta$ -PFT. Other PFT involve clusters of  $\alpha$ -helices, named  $\alpha$ -PFT. In most of the  $\beta$ -PFT, the insertion into the membrane to form the final pore involves only a small part of the protein and the rest of the protein, including the receptor and membrane binding domains, remain outside of the membrane. In some of the  $\beta$ -PFT, the transmembrane region represents a small-unstructured loop motive in the soluble protein that refolds to form the transmembrane  $\beta$ -strand as the case of anthrax protective antigen (PA) toxin or aerolysin from *Aeromonas hydrophila* (Parker and Feil, 2005). In other  $\beta$ -PFT the transmembrane  $\beta$ -strands already exist in the pre-pore, such as the  $\alpha$ -toxin and leukocidins from *Staphylococcus aureus* (Parker and Feil, 2005). Finally, in the case of the CDC toxin family the transmembrane  $\beta$ -strands are formed from existing strands connected by short  $\alpha$ -helices involving an important conformational change to  $\beta$ -strand (see insert of *Figure 1*) (Parker and Feil, 2005). Some toxins require six or seven  $\beta$ -hairpins, each from a different monomer, to form a 12 or 14  $\beta$ -strand-barrel as leukotoxins,  $\alpha$ -toxin, or anthrax PA. Other PFT requires a much higher number of  $\beta$ -strands to form the  $\beta$ -barrel, as is the case of the CDC-toxin family that require more than 35 monomers, each one inserting a pair of  $\beta$ -hairpins in the final pore. In contrast, helical  $\alpha$ -PFT like colicins, have a dynamic structure that involves insertion of preformed  $\alpha$ -helices into the membrane (Parker and Feil, 2005).

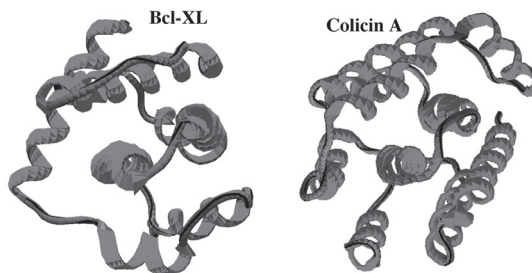
Recently, the structure of some PFT have been compared with cellular proteins that are also capable of breaking the hydrophobic barrier of the membrane as the case of



the membrane-attack complex of complement and perforin (MACPF) that shows some similarities at the 3-D structural level with CDC-toxins (Figure 1), or the apoptosis inhibitor Bcl-XL protein that shows some similarities with colicin (Figure 2) (Anderluh and Lakey, 2008). The analysis of the superposition of the 3-D structures of human-MACPF and CDC toxin intermedilysin (ILY) from *Streptococcus intermedius*, shows that these proteins share 149 residues, that in the CDC toxin correspond to the trans-membrane regions 1 and 2 (Figure 1) (Slade *et al.*, 2008).



**Figure 1.** Ribbon representation of the intermedilysin (ILY) from *Streptococcus intermedius* (PDB number 1S3R) and human membrane-attack complex of complement and perforin (MACPF) (PDB Number 2RD7). This figure was produced by the computer program Swiss Pdb-Viewer. Both proteins show a small region, encircled that shows some similarities at the 3-D structural level. In the CDC toxin, ILY, this region corresponds to the transmembrane region involved in pore formation. Insert shows a schematic representation of the large conformational change that CDC may have during pore formation.



**Figure 2.** Ribbon representation of the apoptosis inhibitor Bcl-xl (PDB number 1r2d) that shows some similarities with colicin A (PDB number 1col). This figure was produced by the computer program Swiss Pdb-Viewer.

### Defense mechanisms evolved by eukaryotic cells to bacterial infections

Eukaryotic cells have several resources to respond to different biotic and abiotic stresses. In the case of pathogen invasion the immune system is constantly challenged to destroy the pathogen and infected cells avoiding the destruction of non-infected tissue (Pedersen, 2007). Two general defense responses have been described, the innate and the adaptive immune responses.

## INNATE IMMUNE RESPONSE

The innate immune system allows the eukaryotic cells to have a quick and broad spectrum of responses. The innate immune cells such as macrophages and dendritic cells directly suppress the pathogenic microorganisms through phagocytosis or by induction of the expression of cytokines, chemokines and costimulatory molecules that participate in pathogen elimination (Akira *et al.*, 2006). In the innate immune system, the major humoral components are the complement enzymes of the alternative, lectin-binding and classical pathways, which involve more than 30 plasma and cell-surface proteins (Honeyman and Harrison, 2004). The complement activation leads to opsonization and killing of pathogens by forming a membrane pore named the MACPF, which results in the lysis of pathogens (Huw, 2008). It is intriguing that eukaryotes evolved also pore-forming proteins as an strategy to defend themselves from pathogen attacks.

The innate response represents the early events that involve pattern recognition receptors (PRR) that recognize general features that microorganisms share named pathogen-associated molecular patterns also known as PAMP in different cellular compartments, such as the plasma membrane, endosomes or cytoplasm. These receptors are evolutionarily conserved and include: Toll-like receptors, retinoic acid-inducible gene-I-like receptors and Nod-like receptors (NLR). These receptors have different cytoplasmic domains, responsible for transducing signals inside of the cell (Honeyman and Harrison, 2004; Huw, 2008). For instance, the effector-domain of NLR bind to the corresponding domains of their downstream signaling cascade inducing the formation of a large multiprotein complex called the inflammasome that recruited caspases resulting in activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B and the mitogen activated protein kinase (MAPK) pathways. The free NF- $\kappa$ B binds then to its target genes, facilitating their transcription, leading to the production of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), and interleukins IL-1 $\beta$  and IL-6. The MAPK pathways include ERK, JNK and p38 subfamilies that also play a pivotal role in the biosynthesis of cytokines (Dong *et al.*, 2002). The pyroptosis is the programmed cell death process that involves the activation of caspase-1 and the inflammasome complex formation.

An alternative cellular mechanism to control bacterial infections is autophagy, which is considered an innate immune mechanism that acts in the intracellular space. Autophagy restricts the infection by sequestering intracellular pathogens in a double membrane structure, named autophagosome that will be delivered to lysosomes for degradation (Deretic, 2006).

## ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE

Only when innate host defense is overwhelmed, the induction of an adaptive immune response is required (Pedersen, 2007). In this condition, the responses of the innate immune system instruct the development of long-lasting pathogen-specific adaptive immune responses. The adaptive system is mediated by antigen receptors on lymphocytes, which produces a more sustained and comprehensive response. This response takes several days to mount, but take advantage of a very large repertoire of antigen receptors. One important characteristic of the adaptive system is that it retains

a memory of exposure to each microbe and ensures the system is mobilized more rapidly upon a subsequent infection by the same pathogen (Huw, 2008).

The adaptive immune system consists of B- and T-cells, which provide pathogen specific immunity to the host through somatic rearrangement of antigen receptor genes. B-cells produce specific antibodies to neutralize pathogens, whereas T-cells provide the cytokine milieu to clear pathogen-infected cells through their cytotoxic effects or via signals to B-cells (Hoebe *et al.*, 2004).

### **Intracellular effects induced by PFT**

The pore formation activity of PFT directly permeabilize the plasma membrane, leading to changes in cytoplasmic ions composition, such as  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{K}^{+}$  ions and also induce changes in osmotic pressure. Recent studies have shown that high concentrations of PFT destroy target cells. However, before the irreversible damage occurs, the cell may trigger sophisticated mechanisms and display signal-transduction pathways as responses to subcytolytic concentrations of PFT. The host responses may include adaptive or innate immunity responses as well as cellular non-immune defenses (Aroian and van der Goot, 2007).

Cells of the immune system such as lymphocytes, macrophages or dendritic cells produce numerous inflammatory molecules and also may undergo apoptosis after PFT action. For instance, interleukins IL-8 and IL-1 $\beta$  are induced after treatment with  $\alpha$ -toxin, aerolysin, pneumolysin (PLY) from *S. pneumoniae*, and Listeriolysin (LLO) from *Listeria monocytogenes* (Shoma *et al* 2008, Chopra *et al* 2000, Bhadki *et al* 1989; Gekara *et al.*, 2007) TNF- $\alpha$  is induced after treatment with aerolysin and Streptolysin O (SLO) from *S. pneumoniae* (Stassen *et al* 2003; Chopra *et al* 2000).

Non-immune cells, such as epithelial cell, vacuolated in response to PFT, and induce MAPK p38 activation (Ratner *et al* 2006; Husmann *et al* 2006; Huffman *et al* 2004; Bischof *et al* 2008)

Toxin-induced membrane permeabilization may activate pathways involved in cell survival or related to cell death. We will review both of these intracellular effect induced by PFT.

### **Mechanisms of cell death induced by PTF**

#### **APOPTOTIC DEATH INDUCED BY PFT AT SUBLYTIC CONCENTRATIONS**

Apoptosis is described as a programmed death process that avoids eliciting inflammation. It is considered to be a regulated and controlled process. The morphology associated with apoptosis is characterized by nuclear and cytoplasmic condensation and cellular fragmentation. The apoptosis pathway implies a metabolic cascade started by initiator caspases (caspase-2, -8, -9 and -10) followed by activation of the effector caspases (caspase-3, -6 and -7) that will cleave different cellular substrates to produce the morphological and biochemical features associated with apoptosis. For example, a DNA ladder is produced by cleavage of genomic DNA between nucleosomes, as a product of a caspase-activated DNase; detachment of apoptotic cells resulted from cleavage of the components of the adhesion complex; and plasma membrane blebbing

resulted from caspase mediated activation of gelsolin an actin depolymerizing-enzyme (Fink and Cookson, 2005).

Several PFT induce cell death by two mechanisms, oncosis and apoptosis, depending on the cell type and on the dose of toxin. When used at low concentrations some PFT induce apoptosis, in contrast to high toxin dose, where cells died quickly by oncosis or necrosis. The participation of the pore formation activity of PFT in the induction of these responses was confirmed by using point mutants affected in pore formation, or by knockout mutants that do not produce the PFT or by reducing toxin expression by antisense RNA. Also, heat inactivated toxins were unable to induce apoptosis or cell death (Genestier *et al.*, 2005; McClane and Chakrabarti, 2004; Katayama *et al.*, 2007; Wiles *et al.*, 2008; Menzies and Kourteva, 2000).

The Panton-Valentine Leukocidin (PVL) from *S. aureus*, is a  $\beta$ -PFT composed by two components, the LukS-PV and the LukF-PV, forming an octameric  $\beta$ -barrel pore. Purified PVL induced apoptosis in neutrophils, monocytes and macrophages when used at sublytic concentrations. This process involves activation of caspases-9 and -3. In contrast, high concentrations of this toxin induced necrotic alterations forming large-pores (*Table 1*) (Genestier *et al.*, 2005). The *Clostridium prefringens* enterotoxin (CPE) at low dose induces typical apoptotic cell death in mammalian CaCo-2 cells. The observed effects include DNA fragmentation with a ladder-pattern, chromatin condensation, mitochondrial membrane depolarization and activation of caspase-3 and -7. Similarly to PVL, a high dose of CPE induces cell death by oncosis showing random DNA shearing. Studies performed with CPE knockout mutant confirmed the importance of this toxin in inducing plasma membrane permeability alterations and in promoting cell death (*Table 1*) (McClane and Chakrabarti, 2004). The parasporin-1 produced by *Bacillus thuringiensis*, the  $\alpha$ -hemolysin (HlyA) produced by *Escherichia coli* (UPEC) and  $\alpha$ -toxin also induces apoptosis cell death when used at low dose (Katayama *et al.*, 2007; Wiles *et al.*, 2008; Menzies and Kourteva, 2000). Parasporin-1 is toxic to certain mammalian cancer cell lines such as HeLa, and induces apoptotic cell death by a mechanism that involves a large influx of extracellular  $Ca^{+2}$  and activation of caspase-3. Synthetic caspase-inhibitors are able to block parasporin-1 cytotoxic activity (Katayama *et al.*, 2007). The HlyA toxin induces apoptosis at sublytic concentrations on different target host cells such as neutrophils, T-lymphocytes, renal and epithelial cells (Wiles *et al.*, 2008) and the  $\alpha$ -toxin triggers apoptosis in endothelial and lymphocytes cells. TUNEL and DNA ladders were observed when cells were treated with at 5 to 20 nM of  $\alpha$ -toxin. High concentrations of  $\alpha$ -toxin induced cell lysis by necrosis. Toxin negative mutants or down regulation experiments of expression of  $\alpha$ -toxin using an anti-sense fragment of  $\alpha$ -toxin gene, show no DNA ladder formation when compared with a clinical *S. aureus* isolate suggesting that low concentration of  $\alpha$ -toxin is responsible of triggering apoptosis in these cells (*Table 1*) (Menzies and Kourteva, 2000).

The aerolysin triggers apoptosis in T-lymphomas at sub-nM concentrations and this effect was overcome at high toxin concentrations, where cells died quickly and apoptotic pathway was not triggered (Nelson *et al.* 1999). The authors used different variants of aerolysin to demonstrate that binding interaction with toxin receptors is not enough to trigger the apoptosis response, nor the clustering of receptors that may be induced by toxin oligomerization induced the intracellular signal for apoptosis activation. It was shown that aerolysin cause apoptosis of T-cells by the production

**Table 1.** Summary of the different responses triggered by PFT that cause cell death.

Toxin	Cell Response	Concentration	Type of cell	Characteristics	Involvement of pore formation	Reference
PVL	Apoptosis	5 nM	Neutrophils, Monocytes	Activation of caspase-9, -3, chromatin condensation	Recombinant PVL, $\Delta$ luk-PV deleted mutant	Genestier <i>et al.</i> , 2005
CPE	Necrosis Apoptosis	200 nM 1 $\mu$ g/ml	Macrophages CaCo-2	DNA fragmentation, chromatin condensation, activation caspase-3, -7 Random DNA shearing	knockout mutant	McClane and Chakrabarti, 2004
SLO	Oncosis Pyroptosis	10 $\mu$ g/ml 1-16 $\mu$ g/ml	Macrophages	Activation caspase-1	Pure toxin, $\Delta$ slo	Timmer <i>et al.</i> , 2008
PLY	Apoptosis	Low dose 0.5 $\mu$ g/ml	Endothelial Neuroblastoma	MAPK p38 activates caspase-6, -9 and -3, DNA fragmentation, chromatin condensation, TUNEL	Ca <sup>2+</sup> influx, $\Delta$ ply deleted mutant.	Guessan <i>et al.</i> , 2005 Stringaris <i>et al.</i> , 2002
	Pyroptosis	Low dose 0.1 $\mu$ g/ml	Macrophages	Activation of caspase-1, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18	knockout mutant	Shoma <i>et al.</i> , 2008
Leukotoxin	Apoptosis	0.2 U <sup>a</sup>	Leukocytes	Inhibition of Akt activation	<i>lktC</i> deficient mutant	Atapattu and Czuprynski, 2005
HlyA	Apoptosis	Sublytic	Neutrophils, T-lymphocyte Renal, 5637 Bladder-epithelial	Inactivate Akt signaling by stimulation of host phosphatases	$\Delta$ hlyA mutant HlyA not-HlyC-activated, Point-mutants Influx of Ca <sup>2+</sup>	Wiles <i>et al.</i> , 2008
$\alpha$ -toxin	Apoptosis	Sublytic 1 $\mu$ g/ml	5637bladder-epithelial	Inactivate Akt signaling		Wiles <i>et al.</i> , 2008
HlyA	Apoptosis	5 to 20 nM	Endothelial Lymphocytes	TUNEL, DNA ladders	Toxin negative mutants. Heat-inactivated toxin	Menzies and Kourteva, 2000
Aerolysin	Necrosis Apoptosis Necrosis	> 50 nM Sub-nM high dose	Endothelial T-lymphomas	Cell detachment but no-TUNEL DNA fragmentation	Increase in Ca <sup>2+</sup> , Point-mutants	Nelson <i>et al.</i> , 1999
Anthrax LT CryIAb	Apoptosis Oncosis	1 $\mu$ g/ml 180 nM	Leukocytes, Macrophages H5 ovarian insect cells	Inactivate Akt signaling Caspase-1, cytokine activation, DNA cleavage Membrane blebbing, activation of adenylyl cyclase, G-protein and protein Kinase A, increase in AMPc.	K <sup>+</sup> efflux Not-determined	Wiles <i>et al.</i> , 2008 Fink <i>et al.</i> , 2008 Zhang <i>et al.</i> , 2006
ParasporinI	Apoptosis	1-10 mg/ml	HeLa	Activation of caspase-3	Influx of Ca <sup>2+</sup>	Katayama <i>et al.</i> , 2007

<sup>a</sup> One U of Leukotoxin was defined as the leukotoxin in dilution causing 50% killing of 106 leukocytes BL-3.

of small number of channels in the cell membrane. Channel formation resulted in a rapid increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , which was speculated to be the signal triggering apoptosis (*Table 1*) (Nelson *et al.*, 1999).

Finally, in the case of PLY toxin it was demonstrated that it induces apoptosis in human endothelial and neuroblastoma cells. The apoptosis pathway was activated through MAPK p38 and JNK pathways. PLY apoptotic cells shows activation of caspases -6, -9 and a late activation of caspase-3. Inhibition of p38 and JNK phosphorylation strongly reduced caspases activation and apoptosis (Guessan *et al.*, 2005). DNA fragmentation and chromatin condensation were observed, and caspase inhibition exert significant protection from PLY induced toxicity. It was reported that extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  influx mediated by PLY pores correlates with activation of MAPK p38 since inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  influx in a  $\text{Ca}^{2+}$  free bathing solution and inhibition of MAPK p38 activity with selective inhibitors such as SB203580, rescued neuronal cells from death, suggesting that  $\text{Ca}^{2+}$  pores induced by PLY, activate MAPK p38 response and correlated with apoptosis death (*Table 1*) (Stringaris *et al.*, 2002).

#### ONCOSIS DEATH INDUCED BY PFT

Cell death by oncosis is characterized by cellular and organelle swelling, blebbing and increase in membrane permeability. Oncosis may result from toxic agents that interfere with ATP generation, or cause uncontrolled cellular energy consumption. Also, altered intracellular  $\text{Ca}^{+2}$  levels can induce oncotic cell death. An essential element of oncosis is its inflammatory nature.

As stated above several PFT (PVL, CPE,  $\alpha$ -toxin, aerolysin) induce oncotic cell death when assayed in high concentrations, although the mechanism that is responsible for oncosis induction remains unknown (*Table 1*) (Genestier *et al.*, 2005; McClane and Chakrabarti, 2004; Menzies and Kourteva, 2000; Nelson *et al.*, 1999).

The only example that explains the mechanism of oncosis death has been reported for the insecticidal Cry1Ab toxin produced by *Bacillus thuringiensis* (Zhang *et al.*, 2006). These studies were performed in H5 insect cell line expressing one receptor of Cry1Ab toxin, the *Manduca sexta* cadherin receptor (Bt-R<sub>1</sub>). The authors demonstrated that cell death was triggered by the interaction of the monomeric Cry1Ab toxin with Bt-R<sub>1</sub>. This binding event activates a  $\text{Mg}^{+2}$  dependent signal cascade pathway that is responsible for oncotic cell death. The cytological changes include membrane blebbing, appearance of ghost nuclei, cell swelling and lysis. It was shown that binding of Cry1Ab to Bt-R<sub>1</sub> activates a G-protein, which in turn activates adenylyl cyclase promoting the production of intracellular cAMP. The increased levels of cAMP activated protein Kinase A that is ultimately responsible for causing cell dead (Zhang *et al.*, 2006). The authors proposed that cell death resulted from a complex cellular response not by osmotic lysis produced by toxin pore formation activity. However, this oncotic process has not been studied in insect-midgut cells and may be particular for this specific cell line, which was originated from ovarian cells of *Trichoplusia ni*. An opposite model explains that the mechanism of Cry1Ab toxin action in insect larvae is due to pore formation activity of the toxin (Bravo *et al.*, 2004, Bravo *et al.*, 2007). In this model, it was proposed that binding with of Cry1Ab toxin to Bt-R<sub>1</sub> facilitates an additional protease cleavage at the N-terminal end of the toxins eliminating helix  $\alpha$ -1 of domain I (Gomez *et al.*, 2002). This cleavage induces assembly of

an oligomeric form of the toxin. The oligomers bind to secondary receptors, which are glycosylphosphatidyl-inositol (GPI)-anchored proteins, such as aminopeptidase N in *M. sexta* and alkaline phosphatase in the lepidopteran *Heliothis virescens* or the dipteran *Aedes aegypti* (Bravo *et al.*, 2007). After the oligomers bind to secondary receptors, they insert into membrane microdomains, where GPI anchored receptors are localized, and create pores in the apical membrane of midgut cells causing osmotic shock, bursting of the midgut cells that result in insect death (Bravo *et al.*, 2004). Recently it was shown that genetic engineered modified Cry1Ab and Cry1Ac toxins that were deleted of amino-terminal end including helix  $\alpha$ -1 (*i.e.* Cry1AbMod and Cry1AcMod) formed oligomers in the absence of Bt-R<sub>1</sub> receptor (Soberón *et al.*, 2007). Interestingly, these modified toxins kill *M. sexta* insects, in which the Bt-R<sub>1</sub> protein was silenced by RNA interference (RNAi) and which resulted in resistance to Cry1Ab. The Cry1AMod toxins also kill *Pectinophora gossypiella* resistant insects in which the Cry1A-resistance had been found to be due to deletions in the cadherin Bt-R<sub>1</sub> gene (Morin *et al.*, 2003, Soberon *et al.*, 2007). In addition, Cry1Ab mutants affected in oligomerization or in pore formation are non-toxic despite the fact that they bind to Bt-R<sub>1</sub> receptor with similar affinity as the wild type toxin and recently it was demonstrated that certain Cry1Ab point mutants that affect pore formation exert a dominant negative phenotype over the native Cry1Ab toxin (Jimenez-Juarez *et al.*, 2007; Rodriguez-Almazan *et al.*, 2009). Overall these results indicate that binding to Bt-R<sub>1</sub> is not enough to trigger cell death in the insect larvae and that oligomerization and pore formation activity are essential steps in the mode of action of Cry toxins. Nevertheless it is still possible that intracellular signals may be triggered by pore-formation induced by Cry toxin in the insect larvae, as has been shown for other PFT (Ariano and van der Goot 2007; Soberón, *et al.*, 2009).

#### PYROPTOSIS INDUCED CELL DEATH BY PFT

Pyroptosis is a caspase-1-dependent inflammatory form of cell death that involves the secretion of the pro-inflammatory-cytokines such as IL-1 $\beta$  and IL-18 after formation of inflammasome complexes. (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2007).

Different PFT activates pyroptosis in target cells. PLY, SLO and lethal toxin (LT) from *B. anthracis* activate caspase-1 in macrophages (Table 1) (Shoma *et al.*, 2008; Timmer *et al.*, 2008; Fink *et al.*, 2008). It was shown that treatment with PLY induces the production of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-18 and a *S. pneumoniae* mutant lacking the *ply* gene was unable to induce this response, suggesting that PLY plays an important role in promoting cell death through pyroptosis (Shoma *et al.*, 2008). In agreement with this observation it was reported that caspase-1 deficient macrophages were more resistant to cell-death induced by another CDC toxin, the SLO toxin (Timmer *et al.*, 2008). The response of macrophages to LT include the stimulation of the inflammasome, cytokine activation, DNA cleavage and lysis mediated by the formation of membrane pores between 1.1 and 2.4 nm that could be blocked by osmoprotectants and glycine (Fink *et al.*, 2008). Interestingly, it was shown that LT proteolytic activity is necessary but not sufficient to trigger this caspase-1 dependent response and that this response depends on pore formation activity of the anthrax PA toxin and K<sup>+</sup> efflux (Fink *et al.*, 2008).

## PFT INACTIVATE THE HOST CELL SURVIVAL AKT PATHWAY PROMOTING CELL DEATH BY APOPTOSIS

Akt, also known as protein kinase B or PKB, is a key regulator of host cell survival pathway. Akt plays an important role in controlling cell cycle, endocytosis and vesicular trafficking, apoptosis inhibition and inflammatory responses to bacterial infections. Akt is activated by phosphorylation downstream PI3-kinase and G-protein coupled-receptors. This cell-survival pathway is inactivated by sublytic concentrations of different PFT such as HlyA, aerolysin,  $\alpha$ -toxin and leukotoxin in leukocytes and epithelial cells (*Table 1*) (Wiles *et al.*, 2008, Atapattu and Czuprynski, 2005). The PFT stimulates specific host phosphatases that inactivate Akt as a result of pore formation and influx of  $\text{Ca}^{+2}$  ions. The pore forming activity of HlyA depends on the presence of an activator protein named HlyC, that is an acyltransferase that acylates HlyA resulting in pore-formation activation. HlyA produced in absence of HlyC insert into the host membrane but is unable to form pores. Under these conditions it is unable to inactivate Akt pathway indicating that pore formation is required to stimulate Akt dephosphorylation. In addition, inactive HlyA mutants unable to make pores or the addition of dextran to external medium, which was shown to block HlyA pores, prevented HlyA induced dephosphorylation of Akt. Akt has several downstream targets such as glycogen synthase kinase involved in cell proliferation, metabolism pathways and inflammatory responses. Then the inactivation of Akt by PFT may adversely affect host inflammatory responses and induce apoptotic response at sublytic concentrations (Wiles *et al.*, 2008)

**Defense mechanisms evolved by eukaryotic cells to PFT**

## ACTIVATION OF MAPK P38 PATHWAY

Epithelial cells start an early immune response, involving activation MAPK p38 pathway after treatment with low concentrations of several PFT. It was demonstrated that the osmotic stress produced after formation of few pores by different PFT in the target cells, induce a MAPK p38-phosphorilation-response that is crucial to prevent bacterial infection (Ratner *et al.*, 2006).

The activation of MAPK p38 after treatment with PFT was first described in *Caenorhabditis elegans* treated with the *B. thuringiensis* Cry5B toxin (*Table 2*) (Huffman *et al* 2004). Later it was shown that other PFT such as aerolysin, PLY, SLO,  $\alpha$ -hemolysin (Hla) from *S. aureus*, and anthrolysin O from *B. anthracis*, also induce a MAPK p38 response in epithelial cells of baby hamster or human embryonic kidney cells when assayed a low doses (*Table 2*) (Huffman *et al.*, 2004, Ratner *et al.*, 2006). It was shown that nM concentration of these toxins are not sufficient to cause cytolysis, but are able to initiate a proinflammatory response at the beginning of the infection involved in defense to PFT and cell survival. It is important to mention that the observed phosphorylation of MAPK p38 protein was correlated with the pore formation activity of these PFT, since toxin deficient mutants or point mutations in toxin regions essential for pore formation activity were unable to induce this p38-response. In addition, the presence of high molecular weight osmolytes, as dextran, in the extracellular medium or calcium chelating compounds, as EGTA, inhibit the



**Table 2.** Summary of the different responses triggered by PFT that cause cell survival.

Toxin	Cell Response	Concentration	Type of cell	Characteristics	Involvement of pore formation	Reference
SLO	Stress	100 ng/ml	Epithelial	Activation of MAPK p38		Ratner <i>et al.</i> , 2006
	Stress	250 ng/ml	Mast cells	MAPK p38 induce TNF- $\alpha$ synthesis	Slo <sup>-</sup> deficient mutant	Stassen <i>et al.</i> , 2003
	Stress	100 ng/ml	HaCaT	Activation of MAPK p38		Husmann <i>et al.</i> , 2006
	Endocytosis	200 ng/ml	Kidney, HeLa	Dynamain-independent	Ca <sup>2+</sup> influx	Idone <i>et al.</i> , 2008
PLY	Stress	50 ng/ml	Epithelial	Activation of MAPK p38	Ply <sup>-</sup> deleted mutant	Ratner <i>et al.</i> , 2006
LLO	Stress	Low dose	Mast cells	TNF- $\alpha$ synthesis	Ca <sup>2+</sup> influx	Gekara <i>et al.</i> , 2007
	Stress	10 ng/ml	HaCaT	Activation of MAPK p38	Point-mutant	Husmann <i>et al.</i> , 2006
$\alpha$ -toxin	Biosynthesis of lipids	30 nM	HeLa	Activation of caspase-1 that activates SREBP	K <sup>+</sup> efflux	Gurcel <i>et al.</i> , 2006
	Endocytosis-exocytosis	500 ng/ml	Cos7, HaCaT	Endocytosis dynamain-dependent	Point-mutants	Husmann <i>et al.</i> , 2009
Aerolysin	Stress	25-50 nM	Epithelial	Activation of MAPK p38		Huffman <i>et al.</i> , 2004
	Biosynthesis of lipids	0.2 nM	HeLa	MAPK p38 activates UPR system		Bischof <i>et al.</i> , 2008
	Biosynthesis of lipids	0.2 nM	CHO, HeLa	Activation of caspase-1 that activates SREBP	Point-mutants	Gurcel <i>et al.</i> , 2006
VCC	Autophagy	60 pM	CHO, CaCo-2	Extensive vacuolation	VCC-Null mutant	Gutierrez <i>et al.</i> , 2007
Hla	Stress	100 pg/ml	Epithelial	Activation of MAPK p38	Hla <sup>-</sup> deficient mutant	Ratner <i>et al.</i> , 2006
	Stress	low dose	<i>C. elegans</i>	Activation of MAPK p38		Huffman <i>et al.</i> , 2004
	Biosynthesis of lipids	low dose		MAPK p38 activates UPR system		Bischof <i>et al.</i> , 2008

stress response, suggesting that osmotic stress probably involves  $\text{Ca}^{2+}$  influx (Ratner *et al.*, 2006).

The activation of MAPK p38 in *C. elegans* or in HeLa cells, after Cry5 or aerolysin treatment respectively, induces the endoplasmic reticulum stress response to unfolded proteins (UPR). The UPR system is a complex response to different stress situations in the cell. The UPR pathway protects cells for accumulation of unfolded proteins during toxin intoxication and increases phospholipids biogenesis to defend against the toxin. One of the transducers-branch that activates UPR response, named *ire-1* arm, is specifically activated by MAPK p38 after treatment of nematode *C. elegans* with the Cry5 PFT. It was proposed that cells have adapted the UPR pathway to promote cellular defense to PFT (Bischof *et al.*, 2008).

The protective role of MAPK p38 pathway in switching on a survival response was also observed in human epithelial cells (HaCaT) and in marrow-derived mast cells after treatment with  $\alpha$ -toxin or SLO, respectively (Table 2) (Husmann *et al.*, 2006; Stassen *et al.*, 2003). Treatment HaCaT cells with  $\alpha$ -toxin at concentrations lower than 10 ng/ml, activates MAPK p38 phosphorylation. This activation correlates with pore formation activity since a pore formation mutant that is still able to bind the cells did not produce that effect. The inhibition of MAPK p38 with the specific SB203580-inhibitor, inhibits the recovery process of cells to membrane damage (Husmann *et al.*, 2006). In mast cells, low doses of SLO activate MAPK p38 pathway and also degranulation. The MAPK p38 up regulates cytokines mRNA expression such as tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ). The production of TNF- $\alpha$  plays an important role in host defense in the murine model since it recruits inflammatory cells that have critical roles in innate and adaptive immunity (Stassen *et al.*, 2003). The TNF- $\alpha$  synthesis in mast cells is also induced by another CDC toxin, the LLO (Table 2). This response depends in LLO induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx from extracellular milieu and release from intracellular stores (Gekara *et al.*, 2007).

#### ACTIVATION OF LIPID BIOSYNTHESIS

Epithelial cells respond to PFT treatment by the activation of central regulators involved in membrane biogenesis (Gurcel *et al.*, 2006). It was reported that in Chinese hamster ovary cells (CHO) and HeLa cells the treatment with aerolysin or  $\alpha$ -toxin triggers  $\text{K}^+$  efflux. The decrease in intracellular  $\text{K}^+$  is linked to the assembly of two types of multiprotein inflammasome complexes (named IPAF and NALP3) that activate caspase-1. The caspase-1 is involved the activation of the central regulator of lipid metabolism, the sterol responsive element binding proteins (SREBP). Caspase-1 triggers the export of SREBP from endoplasmic reticulum and its activation by Golgi proteases. The activated SREBP function as transcription factors that migrate to the nucleus promoting the synthesis of genes involved in membrane biogenesis. The activation of this lipid pathway is directly correlated with cell survival (Table 2) (Gurcel *et al.*, 2006). Pore formation is necessary for activation of SREBP transcription factor since toxin mutants affected in insertion into the membrane or in oligomer formation that lack pore formation activity did not activate this lipid pathway (Gurcel *et al.*, 2006).

In another report it was demonstrated that pretreatment with interferon IFN- $\alpha$  before treatment of lung epithelial cells with  $\alpha$ -toxin prevents cell-death. The IFN-

$\alpha$ -induced protection involves an up-regulation of lipid metabolism that depends on protein synthesis and on the activity of fatty acid synthase (Yarovinsky *et al.*, 2008). This response is independent of MAPK p38 since SB203580 inhibitor has no effect on IFN- $\alpha$ -induced protection (Yarovinsky *et al.*, 2008).

#### ELIMINATION OF PFT BY ENDOCYTIC MECHANISMS

When the plasma membrane of eukaryotic cells is mechanically injured a process that involves exocytosis is triggered and this process is totally dependent in a transient  $\text{Ca}^{2+}$  influx. It is proposed that cells are rapidly resealed by the delivery of intracellular membrane to the damaged-cell surface, thus membrane fusion provide a patching for cell repair (McNeil and Kirchhause, 2005). However this mechanism would not fix a stable transmembrane lesion caused by a PFT and it was demonstrated that repair of transmembrane pores produced by several PFT requires other processes different from the exocytosis-resealing mechanism of mechanical wounds. There are two different mechanisms involved in repairing transmembrane pores induced by PFT in plasma membrane, both involved endocytosis but their main difference resides in their dependence of  $\text{Ca}^{2+}$  influx. In the case of PFT that induce  $\text{Ca}^{2+}$  influx through pore formation, such as SLO that produce pores permeable to  $\text{Ca}^{2+}$  ions, the lesion could be repaired in kidney and HeLa cells by a process that involves endocytosis to remove the SLO containing pores from the plasma membrane (Table 2) (Idone *et al.*, 2008). The endocytosis of early endosomes involved in PFT pore repair is a dynamin-independent mechanism (Idone *et al.*, 2008). By contrast, in the case of PFT that make small pores in the plasma membrane, which are non permeable to  $\text{Ca}^{2+}$  ions such as the  $\alpha$ -toxin, a different endocytic process is involved in the repair of this pore lesion. In this process the eukaryotic cells internalize the pore-complex and then returned it to the extracellular milieu as an exosome structure (Table 2) (Husmann *et al.*, 2009). It has been reported that endocytosis and the later exocytosis as exosomes, rescue HaCat, and Cos7 cells from  $\alpha$ -toxin attack. Cells (Huh7 or HEK293) that have low efficiency at internalizing the PFT did not survive after toxin treatment. This endocytic mechanism is dependent of dynamin and could be specifically inhibited with the inhibitor dynasore, impairing the recovery of ATP-levels after permeabilization with  $\alpha$ -toxin and enhancing cell death (Husmann *et al.*, 2009).

#### PROTECTIVE ROLE OF AUTOPHAGY

As stated above autophagy is a survival mechanism since it may restrict the infection by sequestering the pathogens in the autophagosome and further degradation in lysosomes (Deretic, 2006). *Vibrio cholerae* cytolysin (VCC) is a PFT that generates extensive vacuolation in epithelial cells (Löner *et al.*, 2009). Recently it was shown that VCC modulate autophagy in CHO and CaCo-2 cells as a cellular defense pathway against this toxin and autophagy inhibition resulted in decreased survival of CaCo-2 cells upon VCC intoxication (Gutierrez *et al.*, 2007). The autophagosome formation is induced at low concentrations the toxin as an attempt of the cells to survive, whereas high concentrations of VCC lead to cell lysis (Table 2) (Gutierrez *et al.*, 2007).

## Concluding remarks

When PFT are present at high concentrations, cells cannot deal with high pore formation activity in the plasma membrane and die quickly by oncosis or necrosis since they could not control or compensate the permeability changes. By contrast when the PFT are present in low sublytic concentrations the cells have different strategies to respond against them and promote survival as autophagy, endocytosis, up-regulation of lipid metabolism or activation of stress responses directed by MAPK p38. However low concentrations of PFT can also induce cell death by apoptosis, or pyroptosis depending in the cell type. The main difference between these two processes is the triggering of an inflammatory response that is present only in pyroptosis but not in apoptosis programmed cell death. *Table 1* shows that induction of apoptosis by low doses of PFT is not restricted to immune cells such as neutrophils, monocytes, macrophages, T- lymphocytes, leukocytes, since it has been also observed in other cell types such as epithelial cells as CaCo-2, HeLa, renal and endothelial cells. In contrast pyroptosis has only been observed in macrophages. It was proposed that induction of cell death by apoptosis could be an escaping mechanism that bacteria may have selected to avoid the inflammasome response that could control the infection.

Among the different signal transduction pathways that are activated by PFT, MAPK p38 activation plays an important role. It is clear that MAPK p38 may trigger survival responses to PFT action in several cell types. However, in some others, this pathway activates apoptosis as shown in neuronal cells after treatment with PLY. *Table 2* shows that the cell survival-responses induced by MAPK p38 activation are frequently observed in different cells after treatment with low doses of PFT. In marrow-derived mast cells, activation of MAPK p38 induces TNF- $\alpha$  synthesis. TNF- $\alpha$  recruits inflammatory cells that have critical roles in innate and adaptive immunity. In *C. elegans* and epithelial cells MAPK p38 induces the UPR stress response which protects the cells for accumulation of unfolded proteins during toxin intoxication and increases biogenesis of phospholipids to repair the lesion.

It is interesting that in all cases the signal that triggers the survival or death responses at low dose of PFT is related to the changes in the membrane permeability observed after pore formation activity of PFT. These data are supported by different point mutations in PFT affecting their pore formation activity or knockout mutants where PFT are missing. In addition, the influx of Ca<sup>2+</sup> or the efflux of K<sup>+</sup> seems to be important signals to trigger these responses (*Table 2*). High doses of PFT also kill susceptible cells by producing severe membrane damage due to high pore formation activity (*Table 1*). It is likely that *in vivo* conditions will resemble those of low dose of PFT, triggering cells defense trough -live and -death pathways.

Although the PFT are neither similar at their amino acid sequence nor their structural levels, their mechanism of action is similar since this relies in changing the membrane permeability of their target cells and as a consequence cells have evolved similar mechanisms to avoid or repair membrane damage that would ensure cell survival upon pathogen attack.

## Acknowledgements

This work was supported by CONACyT (U48631-Q); DGAPA-UNAM (IN218608-3, IN210208); NIH 1R01 AI066014 and USDA. 2207-35607-17780.

## References

- AKIRA, S., UEMATSU, S. and TAKEUCHI, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801.
- ANDERLUH, G. and LAKEY J.H. (2008). Disparate proteins use similar architectures to damage membranes. *Trends in Biochemical Sciences* **33**, 482-90.
- AROIAN, R. and VAN DER GOOT, F.G. (2007). Pore-forming toxins and cellular non-immune defences (CNIDs). *Current Opinion in Microbiology* **10**, 57-61.
- ATAPATTU, D.N. and CZUPRYNSKI, C.J. (2005). *Mannheimia haemolytica* leukotoxin induces apoptosis of bovine lymphoblastoid cells BL-3 via caspase-9 dependent mitochondrial pathway. *Infection and Immunity* **73**, 5504-13.
- BHAKDI, S., MUHLY, M., KOROM, S. and HUGO, F. (1989). Release of interleukin-1beta associated with potent cytotoxic action of *Streptococcal* alpha-toxin on human monocytes. *Infection and Immunity* **57**, 3512-9.
- BISCHOF, L.J., KAO, CH-Y., FERDINAND, C.O.L. ET AL. (2008). Activation of the unfolded protein response is required for defenses against bacterial pore forming toxin in vivo. *PLoS Pathogens* **4**, e1000176.
- BRAVO, A., GÓMEZ, I., CONDE, J. ET AL. (2004). Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta* **1667**, 38-46.
- BRAVO, A., GILL, S. S. and SOBERÓN, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **49**, 423-35.
- CHOPRA, A.K., XU, X., RIBALDO, D. ET AL. (2000). The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. *Infection and Immunity* **68**, 2808-18.
- DERETIC, V. (2006). Autophagy as immune defense mechanism. *Current Opinion in Immunology* **18**, 375-82.
- DONG, C., DAVIS, R.J., and FLAVEL, R.A. (2002). MAP kinases in the immune response. *Annual Review in Immunology* **20**, 55-72.
- FERNANDES-ALNEMRI, T., WU, J., YI, J.W. ET AL. (2007). The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell death and differentiation* **14**, 1590-604.
- FINK, S.L. and COOKSON, B.T. (2005). Apoptosis, pyroptosis and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity* **73**, 1907-16.
- FINK, S.L., BERGSBAKEN, T., and COOKSON, B.T. (2008). Anthrax lethal toxin and *Salmonella* elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 4312-17.
- GEKARA, N.O., WESTPHAL, K., MA, B. ET AL. (2007). The multiple mechanisms of Ca<sup>2+</sup> signalling by listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytolysin of *Listeria monocytogenes*. *Cellular Microbiology* **9**, 2008-21.
- GENESTIER, A.L., MICHALLET, M.C., PREVOST, G. ET AL. (2005). *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces BAX-independent apoptosis of human neutrophils. *Journal Clinical Investigation* **115**, 3117-27.

- GÓMEZ, I., SÁNCHEZ, J., MIRANDA, R. *ET AL.* (2002). Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix  $\alpha$ -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS letters* **513**, 242-46.
- GUESSAN P.D.N., SCHMECK, B., AYIM, A. *ET AL.* (2005). *Streptococcus pneumoniae* R6x induced p38 and JNK-mediated caspase-dependent apoptosis in human endothelial cells. *Thrombosis and Haemostasis* **94**, 295-303
- GURCEL, L., ABRAMI, L., GIRARDIN, S. *ET AL.* (2006). Caspase-1 Activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell* **126**: 1135-45.
- GUTIERREZ, M.G., SAKA, H.A., CHINEN, I. *ET AL.* (2007). Protective role of autophagy against *Vibrio cholerae* cytolysin, a pore-forming toxin from *V. cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 1829-34.
- HONEYMAN, M.C. and HARRISON, L.C. (2004). *Immunity: Humoral and Cellular In Encyclopedia of the life Sciences* pp 1-10. New York: John Wiley & Sons. Doi: 10.1038/npg.els.0001235
- HOEBE, K., JANSSEN, E., and BEUTLER, B. (2004). The interface between innate and adaptive immunity. *Nature Immunology* **5**, 971-4.
- HUFFMAN, D.L., ABRAMI, L., SASIK, *ET AL.* (2004). Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10995-1000.
- HUSMANN, M., BECKMANN, E., BOLLER, K. *ET AL.* (2009). Elimination of bacterial pore-forming toxin by sequential endocytosis and exocytosis. *FEBS Letters* **583**, 337-44.
- HUSMANN, M., DERSCH, K., BOBKIEWICZ, W. *ET AL.* (2006). Differential role of p38 mitogen activated protein kinase for cellular recovery from attack by pore-forming *S. aureus*  $\alpha$ -toxin or streptolysin O. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **344**, 1128-34.
- HUW, D.D. (2008). Immune System. In: *Encyclopedia of Life Sciences* eds. John Wiley and Sons, pp1-10. Chichester: DOI: 10.1002/9780470015902.a0000898.pub2
- IDONE, V., TAM, CH., GOSS, J. *ET AL.* (2008). Repair of injured plasma membrane by rapid  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent endocytosis. *Journal of Cell Biology* **180**, 905-14.
- JIMÉNEZ-JUÁREZ, N., MUÑOZ-GARAY, C., GÓMEZ, I. *ET AL.* (2007). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non toxic to *Manduca sexta* larvae. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 21222-9.
- KATAYAMA, H., KUSAKA, Y., YOKOTA H. *ET AL.* (2007). Parasporin-1 a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis* induces  $\text{Ca}^{2+}$  influx and sustained elevation of the cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in toxin sensitive cells. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 7742-52.
- LÖNER, S., WALEV, I., BOUKHALLOUK, F. *ET AL.* (2009). Pore formation by *Vibrio cholerae* cytolysin follows the same archetypical mode as  $\beta$ -barrel toxins from Gram positive organism. *FASEB Journal* fj.08-12688 published online March 10, 2009
- MCCLANE, B. A. and CHAKRABARTI, G. (2004). New insights into the cytotoxic mechanisms of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Anaerobe* **10**, 107-14.
- MCNEIL, P.L. and KIRCHHAUSE, T. (2005). An emergency response team for membrane repair. *Nature Reviews.Molecular Cell Biology* **6**, 499-505.
- MENZIES, B. E. and KOURTEVA, I. (2000). *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces

- apoptosis in endothelial cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **29**, 39-45.
- MORIN, S., BIGGS, R. W., SHRIVER, L. ET AL. (2003). Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 5004-9.
- NELSON, K.L., BRODSKY, R.A. and BUCKLEY, J.T. (1999). Channels formed by subnanomolar concentrations of the toxin aerolysin trigger apoptosis of T lymphomas. *Cellular Microbiology* **1**, 69-74.
- PALMER, M. (2001). The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon* **39**, 1681-9.
- PARKER, M.W. and FEIL, S.C. (2005). Pore forming proteins toxins: from structure to function. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **88**, 91-142.
- PEDERSEN, A. E. (2007). Immunity to Infection. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, pp 1-8. New York: John Wiley & Sons. Doi: 10.1002/9780470015902.a0000478.pub2
- RATNER, A.J., HIPPE, K.R., AGUILAR, J.L. ET AL. (2006). Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 12994-8.
- RODRÍGUEZ-ALMAZÁN, C., ZAVALA, L.E., MUÑOZ-GARAY, C. ET AL. (2009). Dominant negative mutants of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin function as anti-toxins: Demonstration of the role of oligomerization in toxicity. *PLoS ONE* **4**, e5545.
- SCHIAVO, G. and VAN DER GOOT, F.G. (2001). The bacterial toxin toolkit. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**, 530-7.
- SOBERÓN, M., GILL, S.S., and BRAVO, A. (2009). Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**, 1337-49.
- SOBERÓN, M., PARDO-LÓPEZ, L., LÓPEZ, I. ET AL. (2007). Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science* **318**, 1640-2.
- SHOMA, S., TSUCHIYA, K., KAWAMURA, I., ET AL. (2008). Critical involvement of pneumolysin in production of interleukin-1alpha and caspase-1-dependent cytokines in infection with *Streptococcus pneumoniae* in vitro: a novel function of pneumolysin in caspase-1 activation. *Infection and Immunity* **76**, 1547-57.
- SLADE, D.J., LOVELACE, L.L., CHRUSZCZ M., ET AL. (2008). Crystal structure of the MACPF domain of human complement protein C8 $\alpha$  in complex with C8 $\gamma$  subunit. *Journal of Molecular Biology* **379**, 331-342.
- STASSEN, M., MULLER, C., RICHTER, C. ET AL. (2003). The streptococcal exotoxin streptolysin O activates mast cells to produce tumor necrosis factor alpha by p38 mitogen-activated protein kinase- and protein kinase C-dependent pathways. *Infection and Immunity* **71**, 6171-7.
- STRINGARIS, A. K., GEISENHAINER, J., BERGMANN, F. ET AL. (2002). Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neurobiology of Disease* **11**, 355-68.
- TIMMER, A.M., TIMMER, J.C., PENCE, M.A. ET AL. (2009). Streptolysin O promotes group A *Streptococcus* immune evasion by accelerated macrophage apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 862-71.
- WILES, T.J., DHAKAL, B.K., ETO, D.S. and MULVEY, M.A. (2008). Inactivation of host Akt/protein kinase B signaling by bacterial pore-forming toxins. *Molecular Biology*

*of the Cell* **19**, 1427-38

YAROVINSKY, T.O., MONICK, M.M., HUSMANN, M. and HUNNINGHAKE, G.W. (2008). Interferons increase cell resistance to *Staphylococcal* alpha-toxin. *Infection and Immunity* **76**, 571-7.

ZHANG, X., CANDAS, M., GRIKO N.B. *ET AL.* (2006). A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin from *Bacillus truringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 9897-902.



Review

## Role of MAPK p38 in the cellular responses to Pore Forming Toxins.

*Helena Porta, Angeles Cancino-Rodezno, Mario Soberón and Alejandra Bravo.*

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. postal 510-3, Cuernavaca 62250, Morelos, Mexico.

\* Corresponding author. bravo@ibt.unam.mx Phone 52 777 3291635, Fax 52 777 3291624

Helena Porta and Angeles Cancino-Rodezno contributed equally to this work.

### **ABSTRACT**

Understanding the mechanism of action of pore forming toxins (PFT) produced by different bacteria, as well as the host responses to toxin action would provide ways to deal with these pathogenic bacteria. PFTs affect the permeability of target cells by forming pores in their plasma membrane. Target organisms may overcome these effects by triggering intracellular responses that have evolved as defense mechanisms to PFT. Among them it is well documented that stress-activated protein kinases, and specially MAPK p38 pathway plays a crucial role triggering defense responses to several PFTs in different eukaryotic cells. In this review we describe different intracellular effects induced by PFTs in eukaryotic cells and highlight diverse responses activated by p38 pathway.

### **Contents**

#### 1. Introduction

2. Mitogen-activated protein kinases (MAPK) family
3. MAPK p38 pathway as a response to PFT action
  - 3.1 Role of p38 and JNK in the nematode *Caenorhabditis elegans* as a response to Cry PFT
  - 3.2 Role of MAPK p38 in response to PFT in mammalian cells
  - 3.3 Role of p38 as a response to Cry toxin in insects
4. Downstream targets of MAPK p38 pathway specifically activated in response to PFTs
  - 4.1 The unfolded protein response.
  - 4.2 Activation or inhibition of MAPK inflammatory responses.
  - 4.3 Shedding of proteins.
  - 4.4 Death responses activated by p38 MAPK and PFT
5. Other bacterial toxins (non-PFT) that affect MAPK p38 pathway.
6. Additional responses to PFT not related to MAPK p38 pathway
  - 6.1 Hypoxia response
  - 6.2 ERK pathway response
  - 6.3 AKT pathway response
  - 6.4 Activation of the central regulator of lipid metabolism.

## 7. Final Remarks

## Acknowledgments

## References

## Abbreviations

PFT, pore forming toxins; UPR, unfolded protein response; MAPK, Mitogen-activated protein kinases; ERK1/2, extracellular regulated kinases; JNK, Jun NH2 terminal

kinases; IL, interleukin; TNF, Tumor Necrosis Factor; CDC, cholesterol binding cytolysin; SLO, streptolysin O; VLY, vangiinolysin; AnlO, anthrolysin O; PLY, pneumolysin; HlyA, *Escherichia coli* hemolysin; UPR, unfolded proteins response of the endoplasmic reticulum; CyaA, adelylate cyclase toxin; DC, dendritic cells; AC, adelylate cyclase; LeTx, lethal toxin; STx, shiga toxin; hypoxia, low oxygen response; SREBP, master regulator of lipid metabolism.

## **1. Introduction**

Pore forming toxins (PFT) produced by bacteria are virulence factors which play a fundamental role in killing eukaryotic cells by forming holes in the cellular membrane of their targets. They represent a large and diverse group of proteins with a wide range of target cells and although that their amino acid sequences are not conserved, many of them share several aspects of their mechanism of action. In general, the mechanism of action of PFTs involves receptor recognition, activation by proteases, and aggregation into oligomeric-structures that insert into the membrane to form the ionic pores [30] (Fig 1). On the other side, the target organisms have evolved different mechanisms to counteract PFT action. When PFT are present at high concentrations, cells cannot deal with high pore formation activity in their plasma membrane and die quickly [7] (Fig 1). In contrast, when PFT are present in low sublytic concentrations, cells have different strategies to respond against them promoting cell-survival [7] (Fig 1). It has been extensively shown that the stress-activated protein kinases, named p38 and JNK, are activated as a defense response to different PFT in several eukaryotic cells [7]. In this review we describe the diverse responses activated by stress signaling pathways with special description of MAPK p38 and the intracellular effects induced by some PFT in eukaryotic cells.

## **2. Mitogen-activated protein kinases (MAPK) family.**

MAPK family are a group of highly conserved proline-directed, protein-serine/threonine kinases, involved in intracellular cell regulation in response to extracellular signals or physical stresses, such as radiation, osmotic shock and ischemic injury, allowing eukaryotes cells to respond coordinately to multiple inputs. These MAPK families are considered as stress-activated protein kinases controlling host defense systems involved in cell survival and adaptation [25, 31]. The transmission of the extracellular signals to their intracellular targets, is mediated by a network of interacting proteins, governing a large number of cellular processes, such as embryogenesis, cell differentiation, proliferation, surviving, immune responses and death [15, 27]. The MAPKs act in a cascade module called “the central three-tiered core” composed of three kinases: MAPK kinase kinase (MAPKKK), MAPK kinase (MAPKK) and MAPK [41]. The final control of gene expression by MAPK pathways is performed by phosphorylation of transcription factors, but they can also target coactivators and corepressors, leading to the activation or deactivation of a particular signal transduction pathway [41]. The ability of MAPKs to transmit different, even opposing signals, in the same cells depends on the selection of binding motifs and scaffold proteins that guarantees the selective and accurate activation of a specific response to a particular signal [8, 14].

To date, over 50 different protein kinases have been described as contributors to the MAPK pathways in mammals. They have been characterized in six groups: 1) extracellular regulated kinases (ERK1/2), 2) Jun NH2 terminal kinases (JNK1/2/3), 3) p38 (p38 a/b/g/d), 4) ERK7/8, 5) ERK3/4 and 6) ERK5. The most extensively studied groups are ERK1/2, JNK and p38 MAPK. One distinctive feature of these MAPKs is their activation by phosphorylation since each of these three families revealed a

particular signature motif: The ERKs are phosphorylated in the threonine and tyrosine residues that are flanking a glutamic acid residue, forming a TEY motif. The intervening residue in the JNKs is a proline residue, forming a TPY motif and in p38 MAPKs the residues that are phosphorylated are separated by a glycine residue (TGY motif) [24].

ERK1/2 are proteins ubiquitously expressed, but their relative abundance in mammal tissues is variable. The phosphorylation cascade of ERK has been extensively studied and is probably the best understood MAPK pathway [23]. The ERK phosphorylation cascade is initiated by the activation of Ras (a G-protein) by insulin or other mitogens (growth factors) and followed by the sequential activation of Raf1 (MAPKKK), MEK, and ERK. It has been shown that ERKs are able to phosphorylate a large number of substrates in all cellular compartments, including various cytosolic and membrane proteins, as well as nuclear substrates and cytoskeletal proteins. Upon stimulation, a significant proportion of ERK accumulates in the nucleus [10], and it has been suggested that this pathway participate in cell proliferation [5].

Regarding to the JNK and p38 MAPKs pathways, it has been suggested that they mainly respond to stress-associated stimuli, and they are collectively termed stress-activated protein kinases to distinguish them from the archetypal mitogen-activated protein kinases [12, 26].

The JNK pathways are involved in phosphorylation and activation of the transcription factor c-jun. JNK pathway is activated in response to cytokines, UV irradiation, growth factor deprivation, and DNA damaging agents [36]. Most of the targets for JNKs are nuclear hormone receptors and nuclear transcriptional regulators including ATF2, NF-AT4 and p53. The phosphorylation status of these proteins is important to determine their fate, since transcription factors lacking phosphorylation

may be targeted for degradation [36]. JNK pathway is also activated in innate immune response after activation of various members of Toll-like receptor family [13]. JNKs may localize from the cytoplasm to the nucleus following activation [28]. Many mitochondrial proteins, such as the Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Bcl-xl, Bad, Bim and Bax), which have a role in apoptosis, have also been shown to be targets of JNK [28].

MAPK p38 homologues have been identified from yeast to higher eukaryotes. They are also activated by environmental stress and inflammatory cytokines, and could participate in cell proliferation or apoptosis, including cell cycle, immune function, inflammatory responses, such as interleukins (IL), tumor necrosis factor (TNF)-induced cytokines production, induction of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase. Four isoforms of p38 kinases (α, β, γ and δ) have been identified in mammalian cells [33]. These closely related p38 isoforms are not simply redundant proteins, but have specific functions that are determined by the specificity of their upstream activators and the identities and functions of their downstream substrates. Low molecular weight GTP binding proteins (such as Ras), Rho family, chemokines and platelet activating factor have been shown to play role in p38 activation. p38 was shown to be present in both the nucleus and cytoplasm of quiescent cells and directly mediate the activation of several of transcription factors, such as ATF2, MEF2C, CHOP, and the members of the TCF family Elk1 and SAP1. p38s also phosphorylate protein kinases that play a role in the intracellular amplification of signals, including the MAPKAPK2 and MAPKAPK3 kinases, which in turn phosphorylate the small heat-shock protein HSP27 or transcription factors such as ATF1 or SRF, MNK [44].

### **3. MAPK pathway as a response to PFT action**

### 3.1 Role of p38 and JNK in the nematode *Caenorhabditis elegans* as a response to Cry PFT.

*C. elegans* activated both JNK and p38 pathways as a defense mechanism to low doses of Cry5B toxin, a PFT produced by the Gram positive bacterium *Bacillus thuringiensis*. A genomic study performed by microarrays analysis showed that Cry5B toxin up-regulates mRNA accumulation of p38 (PMK-1), SEK-1 (a MAPKK immediately upstream of p38) and JNK kinases [21]. The relevance of SEK-1 and PMK-1 in the defense pathway was demonstrated by feeding *C. elegans sek-1* or *pmk-1* mutants with Cry5B, at low doses wild type were healthier than *sek-1* or *pmk-1* mutated animals, which were severely intoxicated. The authors concluded that SEK-1 and PMK-1 function is to protect the nematodes against Cry5B toxin action. The p38 pathway also protected against Cry21A toxin, but not to infection with other Gram-positive bacteria *B. subtilis* suggesting that p38 pathway may represent a specific response to PFT action [21]. In contrast, JNK mutated animals were hypersensitive to low doses of Cry5B, Cry21A toxins, *B. subtilis* intoxication or Cd, suggesting that JNK pathway has a broader role than p38 pathway responding against other stress agents [21]. However, other reports showed that p38 pathway is activated in *C. elegans* as a response to *Pseudomonas aeruginosa* bacterial infection [39], where PMK-1 activated expression of genes coding for antimicrobials compounds, C- type lectines, lysozymes and neuropeptides. Then p38 pathway has been considered as an immunity pathway in the nematode involved in a general defense mechanism against different pathogen elicitors including pathogen associated molecular patterns or PFT [39].

### 3.2 Role of MAPK p38 in response to PFT in mammalian cells

Several members of the cholesterol binding cytolysin (CDC) PFT family, such as streptolysin O (SLO) produced by *Streptococcus aureus*; the vanginolysin (VLY) produced by *Gardnerella vaginalis*; anthrolysin O (AnlO) produced by *B. anthracis* and pneumolysin (PLY) from *S. pneumonia* as well as other PFT like  $\alpha$ -hemolysin from *Staphylococcus aureus* and proaerolysin from the human pathogen *Aeromonas hydrophyla*, also induced MAPK p38 phosphorylation at subcytolytic concentrations [17, 18, 21, 34, 37]. When CDC toxins bind cholesterol in the cell membrane of eukaryotic targets, the toxin monomers form oligomeric structures that insert into the bilayer forming transmembrane pores. At large toxin doses the eukaryotic cells died rapidly as a consequence of osmotic shock. However, at low doses the membrane could be repaired and cells survive (Fig 1). Activation of p38 and JNK kinases occurs rapidly and transiently. The p38 activation depends on their pore formation activity, since a PLY point mutant affected in pore formation is unable to activate p38 [34] and VLY mutants in domain 4, affected in pore formation are not toxic and neither induced the fast activation of p38 pathway [18]. Finally, inhibition of p38 in hamster kidney cells, with its specific inhibitor SB203580, caused hypersensitivity to proaerolysin [21].

Osmotic stress produced as consequence of disruption of membrane integrity has been proposed as the main effect that triggers activation of p38. It was shown that Dextran or cellulose could block membrane disruption caused by PLY or  $\alpha$ -hemolysin on epithelial cells and these treatments also inhibited p38 phosphorylation [34]. It is proposed that epithelial cells perception of osmotic stress via MAPK p38 activation acts as an early stress response to PFT.

The  $\alpha$ -toxin produced by *S. aureus* also induces MAPK p38 phosphorylation in immortalized keratinocyte cells (HaCaT). A role of  $K^+$  efflux as an inductor of p38 phosphorylation was proposed, since HaCaT cells treated with nigericin, a specific  $K^+$



ionophore, resulted in a drop of  $K^+$  concentration simultaneously with p38 phosphorylation [22]. In addition, a high concentration of extracellular  $K^+$  blocked the p38 activation induced by different PTF such as  $\alpha$ -toxin, *Vibrio cholerae* cytolysin, SLO or *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) [22], suggesting that  $K^+$  efflux throughout the toxin pore might activate the p38 defense response. It was also reported that activation of p38 by PFT is non-dependent of TLR4 immune receptor since HlyA or SLO toxins are sufficient to activate p38 in epithelial cells or human embryonic kidney cells (HEK-293) lacking CD14, a coreceptor of TLR4 [22].

Overall, these results indicate that p38 pathway is activated in mammalian cells and in nematodes to protect them against different PFTs, and that their pore formation activity is important to trigger this response.

### 3.3 Role of p38 as a response to Cry PFT in insects.

In insects, similar responses were observed, since larvae of two different insect orders, Lepidopteran and Dipteran, also activated p38 phosphorylation after treatment with Cry toxins [6]. Cry1Ab is highly toxic against the lepidoptera *Manduca sexta* larvae, while Cry11Aa is active against the diptera larvae of *Aedes aegypti*. Phosphorylation of p38 was observed rapidly when *M. sexta* or *A. aegypti* larvae were treated with the medium lethal concentration dose of Cry1Ab or Cry11Aa, respectively. It is important to mention that the non-toxic Cry1Ab- or Cry11Aa-mutants affected in pore formation activity were unable to activate p38 in both insect larvae. These observations support the proposition that pore formation into the cell membrane is indispensable for p38 activation [6]. The role of p38 in defense mechanism of *M. sexta* and *A. aegypti* against Cry toxins was confirmed using iRNA-mediated knockout of p38 protein. Both insect larvae lacking this kinase became hypersensitive to Cry toxin

intoxication, supporting again that p38 pathway has a protective function against PFT in insects.

#### **4. Downstream targets of MAPK p38 pathway specifically activated in response to PFTs.**

Regarding to the identification of the key downstream targets of the p38 that are specifically activated in response to PFTs, it was shown by comparison of microarray analysis of *C. elegans* wild type or p38 silenced animals, that treatment with Cry5B resulted in activation of two p38 dependent genes named *ttm-1* and *ttm-2* [21]. Analysis of animals affected in the expression of these genes by iRNA knockout, showed hypersensitivity to Cry5B and to Cd confirming that they are targets of p38 involved in a defense response. The gene *ttm-1* was further characterized, showing homology to the human zinc transporter ZnT-3. Suggesting a possible role in removing cytotoxic cations as a defense mechanism [21] (Fig 1).

##### **4.1 The unfolded protein response.**

A systematic genetic analysis performed to identify genes involved in resistance to Cry5B toxin in the nematode *C. elegans*, allowed the identification of additional genes as targets of p38 in the defense mechanism [4]. The stress response to the unfolded proteins of the endoplasmic reticulum (UPR) was reported to be involved in the defense to PFT in this animal. Specifically the *ire-1 xbp-1* arm of UPR is responsible of the survival response in the nematode since mutations in these genes resulted in worms that were hypersensitive to the pore forming toxin Cry5B (13 fold higher susceptibility) but not to the treatments with CuSO<sub>4</sub> or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [4]. The activation of *ire-1* and *xbp-1* pathway depends of p38, since their activation did not occur in

worms mutated in the *sek-1* or *pmk-1* p38 genes. However it is important to take in account that the defense response induced by p38 in the nematode is quite complex, since mutations in *sek-1* resulted in a 170-fold increase in the susceptibility to Cry5B [4]. The role of UPR as a defense mechanism seems to be general since IRE-1 was also activated in HeLa cell line after treatment with aerolysin [4]. It has been suggested that the IRE-1 pathway could influence immunity response by its association with TRAF-2, which in turns regulates the transcription factor NF- $\kappa$ B [43] (Fig 1). It may be also relevant that IRE-1 pathway leads to phospholipid-biogenesis, which may be linked to its protective role against PFT.

#### 4.2 Activation or inhibition of MAPK inflammatory responses.

Several PFT activate p38-dependent inflammatory responses in their target cells. The VLY and PLY toxins activate p38 pathway and consequently induces up regulation of mRNA levels for IL-8, the major neutrophil chemokine and treatment with the specific p38 inhibitor SB203580 abolished this response [18, 34] (Fig 1).

Low doses of SLO in mast cells produced TNF- $\alpha$  and other cytokines such as IL-13, IL-4 and IL-6 (Fig 1). In addition, granulocyte macrophage-colony stimulated factor and monocyte chemoattractant protein-1 are also accumulated in response to SLO. SLO oligomerization and pore formation are indispensable for this response since a SLO mutant that binds to the membrane but suppresses the oligomerization and pore formation of the toxin was unable to produce TNF- $\alpha$ . Inhibition of p38 with SB203580 strongly prevents TNF- $\alpha$  production, without affecting degranulation [37].

The anthrax lethal toxin (LeTx) from *B. anthracis* is composed of the protective antigen and the lethal factor. The protective antigen is the cell binding element and the PFT component of the toxin that delivers the lethal factor into the mammalian cell

cytosol where its specific proteolytic activity cleaves members of the MAPKKs family. The LeTx severely affects the immune response by down-regulating the expression of cytokines such as IL-8 [11].

The adelylate cyclase toxin (CyaA) produced by *Bordetella pertussis* is a particular case since is a PFT that affects the plasma membrane of macrophages and dendritic cells (DC) harboring the receptor CD11b/CD13  $\alpha_M\beta_2$  integrin. CyaA has a pore forming region composed of four hydrophobic segments that makes pores in black lipid bilayers [3]. However, it also has a high adelylate cyclase (AC) catalytic activity that increased intracellular levels of cyclic AMP [16] and inhibits the expression of pro-inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$  and IL-12p70 in DC and affects their maturation to Th helper cells. These effects depend on its AC activity and on p38 induction [16]. The down regulation on DC functions exerted by CyaA toxin has been considered as a mechanism adopted by the bacterium to hamper the host immune response [16].

#### 4.3 Shedding of proteins.

Another response modulated ERK1/2 and p38 pathways is the shedding of proteins such as the ectodomains of Syndecan-1 and E-cadherin from cell surface observed after treatment with  $\alpha$ -toxin [29], AnIO or LeTx [32] (Fig 1). Syndecans are involved in modulation of cell spreading, adhesion, motility and maintenance of intercellular contacts [32]. It was proposed that the shedding could help to enhance host colonization by altering the morphology of cells and compromising the integrity of protective barriers of epithelial tissue. Shedding of aminopeptidase-N was also observed in the insect *Lymantria dispar* in response to Cry1Ab toxin [40], suggesting that this response after PFT treatment could be rather general.

#### 4.4 Death responses activated by p38 MAPK and PFT

In the case of PLY it was demonstrated that activation of p38 and JNK pathways induces apoptosis in human endothelial and neuroblastoma cells by activation of caspases -6, -9 and a late activation of caspase-3. DNA fragmentation and chromatin condensation were also observed [19]. The extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  influx by PLY action and p38 phosphorylation correlated with this response, since inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  influx in a  $\text{Ca}^{2+}$  free bathing solution or inhibition of p38 activity with selective inhibitors such as SB203580, strongly reduced caspases activation, and apoptosis response then neuronal cells could be rescued from death, suggesting that  $\text{Ca}^{2+}$  pores induced by PLY, activate MAPK p38 response and correlated with apoptosis [38, 19].

#### 5. Other bacterial toxins (non-PFT) that affect MAPK p38 pathway.

The shiga toxin (STx) is a member of the AB5 family which is characterized by a bipartite structure consisting of a pentameric B5 moiety involved in receptor binding and the catalytic A subunit, which is a N-glycosidase that inactivate the protein synthesis machinery. Both subunits are not covalently linked. The B5 subunit bind Gb3 glycolipids and follow a retrograde trafficking pathway that facilitates toxin access to the cytosol. The STx activates p38 pathway, which in turns activates an inflammatory response inducing expression of IL-6 and  $\text{TNF}\alpha$ . It was shown that inhibition of p38 with the selective inhibitor SB202190 blocks MAPK p38 activation and the inflammatory response [35].

#### 6. Additional responses involved in defense to PFT but not related to MAPK p38 pathway

##### 6.1 Hypoxia response

Up regulation of low oxygen response (hypoxia) pathway confers resistance to Cry21A in the nematode *C. elegans* and to VCC in mammalian cells [2]. Elimination of the hypoxia inducible factor 1, that is one of the main effectors of hypoxia pathway, leads to hypersensitivity to PFT; besides, the exposure of the nematodes to low oxygen confers protection against PFT. It was reported that hypoxia functions upstream activating the XBP-1 arm of the UPR that, as mentioned above, is involved in defense to PFT action [43].

## 6.2 ERK pathway response

An additional pathway that confers resistance to PFT in *C. elegans* is a special branch of the DAF-2 Insulin-like signaling network involving WWP-1 protein [9]. This pathway regulates development, metabolism, and longevity in the nematode. The main branch includes DAF-2, which is the homolog of the insulin/IGF-1 receptor in mammals, activation of this receptor resulted in the activation of the serine/threonine kinases AKT/PKB. It was shown that a mutant defective of DAF-2 is ten times more resistant to Cry5B toxin. The DAF-2 network includes a putative E3 ubiquitin ligase WWP-1 involved in promoting innate immunity against pathogenic bacteria and in promoting life span [9]. Mutations in *wwp-1* gene become hypersensitive (six fold) to Cry5B toxin, suggesting that this protein is involved in the nematode defense to PFT [9].

## 6.3 AKT pathway response

Sublytic concentrations of different PFT such as HlyA, aerolysin,  $\alpha$ -toxin and leukotoxin in leukocytes and epithelial cells are able to stimulate specific host phosphatases that inactivate AKT [1, 42]. AKT is also known as protein kinase B or

PKB, it is a key regulator of host cell survival playing an important role in controlling cell cycle, vesicular trafficking, apoptosis inhibition and inflammatory responses to bacterial infections. The inactivation of AKT response by PFT depends on their pore formation activity and influx of  $\text{Ca}^{+2}$  ions. This inactivation of AKT by PFT adversely affects host inflammatory responses and induces apoptotic response at sublytic concentrations [42].

#### 6.4 Activation of the central regulator of lipid metabolism.

Chinese hamster ovary cells and HeLa cells treated with aerolysin or  $\alpha$ -toxin triggers the  $\text{K}^{+}$  efflux that is linked to the activation of the master regulator of lipid metabolism (SREBP) [20]. The activated SREBP function as transcription factor that promoted the synthesis of genes involved in membrane biogenesis, leading into a defense response against to PFT damage. Pore formation activity is linked to this response since toxin mutants affected in membrane insertion or in oligomer formation that lack pore formation activity did not activate SREBP pathway [20].

### 7. Final Remarks

The analysis of cellular responses to PFT has revealed conserved responses in different organisms. Among these, activation of protein kinase p38 is a conserved response in nematodes, insects and mammals. This signal transduction pathway is trigger by low doses of PFT promoting in most of the cases the cell survival. It has been extensively shown that activation by phosphorylation of this stress-activated p38 pathway depends on  $\text{K}^{+}$  efflux or  $\text{Ca}^{2+}$  influx induced by PFT. Different isoforms of p38 kinases (a, b, g and d) have been identified in mammalian cells [33], and each one of these proteins has specific functions determined by their upstream activators and

their downstream substrates resulting in initiation of a wide variety of secondary responses. The secondary consequences of p38 activation will depend on the type PFT and on the target cell resulting in initiation of different mechanisms involved in protection against PFT and in few cases in activation of programmed death responses.

The identification of the different scaffold proteins that are responsible of the selective and accurate responses activated by p38 after PFT intoxication in different organisms could provide ways to counter act the action of bacterial pathogens or to enhance the activity of biotechnological important PFT as Cry toxins produced *B. thuringiensis* that have insecticidal activity.

### **Acknowledgments**

This work was supported in part from CONACyT U48631-Q; DGAPA-UNAM IN206209 and IN218210; and NIH 1R01 AI066014.

### **References**

- [1] Atapattu DN, Czuprynski CJ. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin induces apoptosis of bovine lymphoblastoid cells BL-3 via caspase-9 dependent mitochondrial pathway. *Infect Immunol* 2005; 3:5504-5513.
- [2] Bellier A, Chen Ch-S, Kao Ch-Y, Cinar HN, Aroian RV. Hypoxia and the hypoxic response pathway protect against pore-forming toxins in *C. elegans*. *PLoS Pathogen* 2009; 5:12 e1000689 1-13.
- [3] Benz R, Maier E, Landant D, Ullmann A, Sebo P. Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis* evidence fro the formation of small ion permeable channels and comparison with HlyA of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1994; 269:27231-27239.



- [4] Bischof LJ, Kao Ch-Y, Los FCO, Gonzalez MR, Shen Z, Briggs SP, van der Goot FG, Aroian RV. Activation of the unfolded protein response is required for defenses against bacterial pore forming toxin *in vivo*. *PLoS Pathogens* 2008; 4:e1000176
- [5] Boultron TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenhesser SD, DePino RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 1991; 65:663-675.
- [6] Cancino-Rodezno A, Alexander C, Villasenor R, Pacheco S, Porta H, Pauchet Y, Gill SS, Soberon M, Bravo A. The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2009; 40:58-63.
- [7] Cancino-Rodezno A, Porta H, Soberón M, Bravo A. Defense and death responses to pore pore forming toxins. *Biotechnol Gen Eng Rev* 2009; 26:65-94.
- [8] Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; 410:211–218.
- [9] Chen Cha S, Bellier A, Kao Ch-Y, Yang Y-L, Chen H-D, Los FCO, Aroian RV. WWP-1 is a novel modulator of the DAF-2 insulin-like signaling network involved in pore-forming toxin cellular defenses in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 2010; 5: e9494.
- [10] Chen RH, Sarnecki C, Blenis J. Nuclear localization and regulation of Erk- and Rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* 1992; 12:915–927.

- [11] Chow EMC, Batty S, Modridge J. Anthrax lethal toxin promotes dephosphorylation of TTP and formation of processing bodies. *Cell Microbiol* 2010; 12:557-568.
- [12] Dérijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 1994; 76:1025–1037.
- [13] Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:55–72.
- [14] Ebisuya M, Kondoh K, Nishida E. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J Cell Sci* 2005; 118:2997-3002.
- [15] Errede B, Cade RM, Yashar BM, Kamada Y, Levin DE, Irie K, Matsumoto K. Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol Rep Develop* 1995; 42: 477-485.
- [16] Fedele G, Spensieri F, Palazzo R, Nasso M, Cheung GY, Coote JG, Ausiello CM. *Bordetella pertussis* commits human dendritic cells to promote Th1/Th17 response through the activity of adenylate cyclase toxin and MAPK- pathway. 2010; *PLoS One* 15:5(1) e8734.
- [17] Fickl H, Cockeran R, Steel HC, Feldman C, Cowan G, Mitchell TJ, Anderson R, Pneumolysin-mediated activation of NFkappaB in human neutrophils is antagonized by docosahexaenoic acid. *Clin Exp Immunol* 2005;140:274-81.
- [18] Gelber SE, Aguilar JL, Lewis KLT, Ratner AJ. Functional and phylogenetic characterization of vaginolysin the human specific cytolyisin from *Gardnerella vaginalis*. *J Bacteriol* 2008; 190:3896-3903.
- [19] Guessan PDN, Schmeck B, Ayim A, Hocke AC, Brell B, Hammerschmidt S,

- Rosseau S, Suttorp N, Hippenstiel S. *Streptococcus pneumoniae* R6x induced p38 and JNK-mediated caspase-dependent apoptosis in human endothelial cells. *Thromb Haemost* 2005; 94:295-303.
- [20] Gurcel L, Abrami L, Girardin S, Tschopp J, van der Goot FG. Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell* 2006; 126:1135–1145.
- [21] Huffman DL, Abrami L, Sasik Corbeil J, van der Goot FG, Aroian RV,. Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:10995-1000.
- [22] Kloft N, Busch T, Neukirch C, Weis S, Boukhallouk F, Bobkiewicz W, Cibis I, Bhakdi S, Husmann M .Pore-forming toxins activate MAPK p38 by causing loss of cellular potassium. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 385:503-506.
- [23] Kolch W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:827-837.
- [24] Kosako H, Gotoh Y, Matsuda S, Ishikawa M, Nishida E. *Xenopus* MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *EMBO J* 1992; 11:2903-2908.
- [25] Krishna M, Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:3525–3544.
- [26] Kyriakis JM, Bnerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Ribie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 1994; 369:156-160.
- [27] Mizukami Y, Yoshida KI. Mitogen-activated protein kinase translocates to the nucleus during ischemia and is activated during reperfusion. *Biochem. J* 1997; 323:785 –790.

- [28] Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Cancer Res* 1998; 58:3163-3172.
- [29] Park PW, Foster TJ, Nishi E, Duncan SJ, Klagsbrun M, Chen Y. Activation of syndecan-1 ectodomain shedding by *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin and  $\beta$ -toxin. *J Biol Chem* 2004; 279:251-259.
- [30] Parker MW, Feil SC. Pore forming proteins toxins: from structure to function *Progress Biophys Mol Biol* 2005; 88:91-142.
- [31] Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001; 22:153–118.
- [32] Popova TG, Millis B, Bradburne Ch, Nazarenko S, Bailey Ch, Chandhoke V, Popov SG. Acceleration of epithelial cell syndecan-1 shedding by anthrax hemolytic virulence factors. *BMC Microbial* 2006; 6:8
- [33] Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 1995; 270:7420-7426.
- [34] Ratner AJ, Hippe KR, Aguilar JL, Bender MH, Nelson AL, Weiser JN. Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins. *J Biol Chem* 2006; 281:12994-12998.
- [35] Saenz JB, Li J, Hasiam DB. The MAP kinase-activated protein kinase 2(MK2) contributes to the shiga toxin-induced inflammatory response. *Cell Microbiol* 2010; 12:516-529.

- [36] Sanchez-Prieto R, Rojas JM, Taya Y, Gutkind JS. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 2000; 60:2464–2472.
- [37] Stassen M, Muller C, Richter C, Neudorfl C, Hultner L, Bhakdi S, Bhakdi S, Walev I, Schmitt E. The Streptococcal exotoxin streptolysin O activates mast cells to produce tumor necrosis factor alpha by p38 mitogen-activated protein kinase- and protein kinase C-dependent pathways. *Infect Immun* 2003; 71:6171-6177.
- [38] Stringaris AK, Geisenhainer J, Bergmann F, Balshusemann C, Lee U, Zysk G, Mitchell TJ, Keller BU, Kuhnt U, Gerber J, Spreer A, Bahr M, Michel U, Nau R. Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neurobiol Dis* 2002; 11:355-368.
- [39] Troemel ER, Chu SW, Reinke V, Lee SS, Ausubel FM, Kim DH. p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C. elegans*. *PLoS Genet* 2006; 2:e183.
- [40] Valaitis A. *Bacillus thuringiensis* pore-forming toxins trigger massive shedding of GPI-anchored aminopeptidase N from gypsy moth midgut epithelial cells. *Insect Biochem Mol Biol*. 2008; 38:611-618.
- [41] Widmann CS, Gibson MB, Jarpe MB, Johnson GL. MAPK pathways: conservation of a three-kinase module from yeast to man. *Physiol Rev* 1999; 79:143–180.
- [42] Wiles TJ, Dhakal BK, Eto DS, Mulvey MA. Inactivation of host Akt/protein kinase B signaling by bacterial pore-forming toxins. *Mol Biol Cell* 2008; 19:1427-1438

[43] Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005; 115:2656-2664.

[44] Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 2005; 15:11-18.

### Figure legend

Figure 1. Role of MAPK p38 in activating responses to PFT action.

The mechanism of action of PFTs involves receptor recognition (1), activation by proteases (2), and aggregation into oligomeric-structures that insert into the membrane to form the ionic pores(3). When PFT are present at high concentrations, cells cannot deal with high pore formation activity in their plasma membrane and die quickly. But, when PFT are present in low sublytic concentrations, activation of p38 pathway may trigger different strategies in the cells to respond against PFT action.

