

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

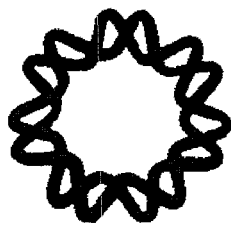
Identificación de una  $\alpha$ -amilasa como un nuevo receptor  
de las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa  
de *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis*  
en el mosquito vector de malaria  
*Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae)

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A

*M. en C. María Teresa Fernández Luna*

DIRECTOR DE TESIS  
DR. JUAN MIRANDA RÍOS



Cuernavaca, Morelos. Mayo de 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

*El presente trabajo fué realizado  
en el laboratorio del  
Dr. Mario Soberón Chávez,  
perteneciente al  
Departamento de Microbiología Molecular  
del Instituto de Biotecnología  
de la UNAM.*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar al Dr. Juan Miranda Ríos, por su dirección y enseñanzas a lo largo de esta ruta.

Al Dr. Soberón por brindarme su confianza y todo su apoyo en este trabajo.

De una manera muy especial a la Dra. Susana López Charretón, por ser uno de los pilares más importantes en mi formación académica.

A los Dres. Guadalupe Espin, José Luis Puente, Lorenzo Segovia y Humberto Lanz, por su minuciosa revisión de esta tesis, cuyas sugerencias mejoraron la claridad de este escrito.

A Sabino, Iván, Claudita, Erandi, Teresita, Isabel, Fernando, Sergio, Alejandro y Jorge, por todo su apoyo y amistad.

A Pedro Romero, al M. en C. Alain de Jesús Hernández Vázquez y a la Q.F.B. Martha Elva Pérez Andrade, por su asistencia Técnica en la elaboración de la Tesis y sobre todo por su hermosa amistad.

A CONACYT por la beca de Doctorado para la realización de este proyecto.

A la *Universidad Nacional Autónoma de México*, mi esperanza para un *México* más humano.



DEDICADA A:

*A mis Padres,*

*Por su amor infinito,  
por su dechado de lucha y entereza frente a la vida.*

*A mis hermanas, Adriana y Roxana,  
por su radiante existencia.*

*A Juan Pablo, Félix, Gerardo y Diana,  
mis amores, mi esperanza, mi motivo de lucha.*

*A mi abuelito Félix, un hombre excepcional.*

## ÍNDICE

1.- Resumen	1
2.- Abstract	2
3.- Introducción	3
4.- Malaria	4
5.- Toxinas Formadoras de Poro	8
5.1.- $\alpha$ -TFP	9
5.2.- $\beta$ -TFP	12
6.- <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
6.1.- <i>Bacillus thuringiensis ssp. israelensis</i>	14
6.2.- Clasificación y Nomenclatura de las $\delta$ -endotoxinas	15
7.- Toxinas Cry	15
7.1.- Estructura de las toxinas Cry	16
7.2.- Receptores de las toxinas Cry	18
7.2.1.- Aminopeptidasa N	18
7.2.2.- Caderina	20
7.2.3.- Fosfatasa Alcalina	21
7.2.4.- Glicosfingolípidos	22
7.3.- Respuestas celulares inducidas por la exposición a las toxinas Cry	24
7.3.1.- Formación de poros en la membrana celular	24
7.3.2.- Estimulación de la Adenilato Ciclasa y activación de la Proteína Cinasa A	24
7.3.3.- Transducción de señales	25
8.- Toxinas Cyt	27
8.1.- Estructura de las toxinas Cyt	27
8.2.- Respuestas celulares inducidas por la exposición a las toxinas Cyt	29
8.2.1.- Formación de Poros	29
8.2.2.- Acción tipo detergente	30
8.2.3.- Sinergismo entre Cyt1A y Cry11A	31
9.- Efecto de las interacciones entre las toxinas Cyt y Cry	31
9.1.- Sinergismo entre toxinas Cry	32

10.- <i>Anopheles albimanus</i> , principal vector de Malaria en México	32
Hipótesis	34
Objetivo General	34
Objetivos Particulares	34
Resultados	35
Apéndice I. Contribución original <sup>1</sup>	36
Resumen	37
Apéndice II. Contribución original <sup>2</sup>	50
Resumen	51
11.- Discusión y Perspectivas	55
12.- Referencias	63
Anexos	73

## 1.- RESÚMEN

La malaria representa la principal causa de muerte por enfermedades provocadas por protozoarios en el mundo. El mosquito *Anopheles albimanus* es el principal vector de malaria desde el sur de E.U. hasta el norte de Perú. Este mosquito es susceptible al cristal sintetizado por la bacteria *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis* (*Bti*). Este cristal está compuesto por cuatro toxinas Cry: Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa y dos toxinas Cyt: la Cyt1Aa y la Cyt2Ba. En este trabajo se reporta que los componentes más tóxicos del cristal de *Bti* en contra de este mosquito son las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa, mientras que la toxina Cyt1Aa por sí sola no presentó actividad letal aún a altas concentraciones. Además, se observó la existencia de sinergismo entre las toxinas Cyt1Aa y Cry4Ba, entre Cyt1Aa y Cry11Aa, así como entre Cry4Ba y Cry11Aa. El componente más importante en el fenómeno de sinergismo observado es la toxina Cyt1Aa, funcionando probablemente como un receptor soluble de las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa. Además de la posible participación de Cyt1Aa como receptor soluble, también se identificó una nueva clase de receptor para las toxinas Cry, una  $\alpha$ -amilasa anclada a la membrana por glicosilfosfatidilinositol, la cual es una enzima localizada en el intestino de las larvas de *An. albimanus*. La identificación de esta molécula como proteína de unión de las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa se determinó mediante las técnicas de espectrometría de masas, de cromatografía de afinidad, la determinación de la actividad enzimática, la clonación del cDNA, así como por medio de ensayos de unión de la proteína expresada de manera heteróloga a las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa.

## 2.- ABSTRACT

Malaria represents the leading cause of death by protozoarian provoked diseases in the world. *Anopheles albimanus* is the main vector of malaria from the South of the U.S. to the North of Peru. This mosquito is susceptible to the crystal produced by the bacteria *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis* (*Bti*). The *Bti* crystal is composed by four Cry toxins: Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, and two Cyt toxins: Cyt1Aa and Cyt2Ba. In this work we found that the most toxic components of the *Bti* crystal to *An. albimanus* are the proteins Cry4Ba and Cry11Aa, while Cyt1Aa *per se* was not toxic at all even when administered at very high levels. Synergism was observed between toxin pairs Cyt1Aa-Cry4Ba, Cyt1Aa-Cry11Aa, and Cry4Ba-Cry11Aa. For synergism, the most important component observed was toxin Cyt1Aa that could be functioning as a soluble receptor for toxins Cry4Ba and Cry11Aa. In addition to the participation of Cyt1Aa toxin as a putative receptor, we identified a novel class of receptor for Cry toxins, a glycosylphosphatidylinositol-anchored  $\alpha$ -amylase present in the midgut of *An. albimanus* larvae. The identification of the  $\alpha$ -amylase protein as a binding molecule of Cry4Ba and Cry11Aa toxins was determined by mass spectrometry, affinity chromatography, enzymatic activity assays, cloning of the cDNA and binding of the heterologously expressed protein to Cry4Ba and Cry11Aa toxins.

### 3.- INTRODUCCIÓN

Una de las amenazas más graves que enfrenta la humanidad son las enfermedades transmitidas por los mosquitos, las cuales se estima que provocan la enfermedad en 700 millones de personas al año (WHO, 1996). Entre las enfermedades causadas por la picadura de los mosquitos, se destacan por su importancia la malaria, la fiebre amarilla, el dengue y la filariasis linfática. En particular, la malaria, a pesar de los esfuerzos para su erradicación, causa un millón de muertes y quinientos millones de casos clínicos al año, de los cuales cerca del 90% se originan en África (Aly *et al.*, 2009).

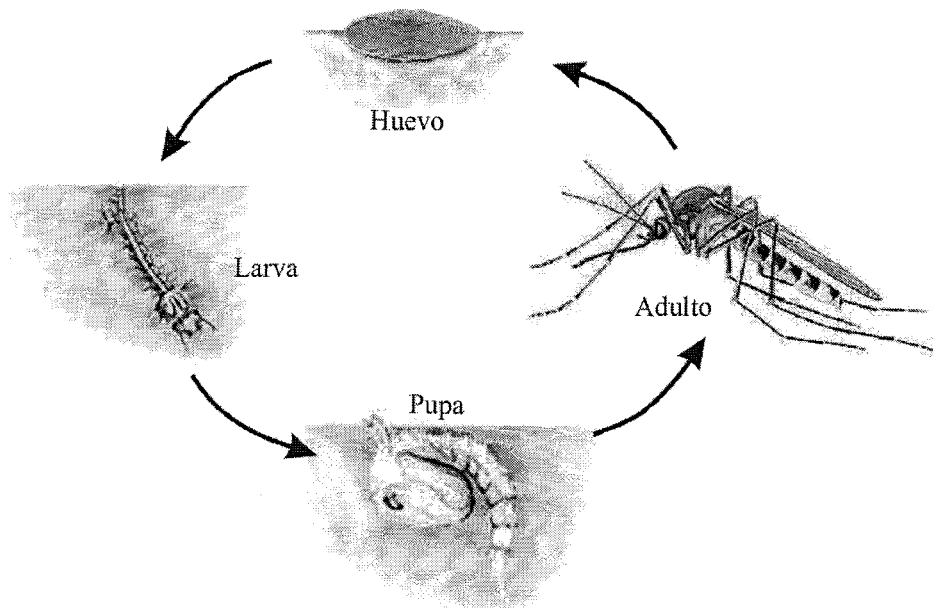
Una manera de detener la diseminación de las enfermedades causadas por mosquitos es el control de las poblaciones de éstos. La estrategia más utilizada está basada en la aplicación de insecticidas químicos, pero la aplicación de estos productos por más de cuarenta años ha generado la aparición de resistencia en estos vectores. Otros problemas asociados al uso de insecticidas químicos es que al no ser específicos, provocan la muerte de organismos que son inofensivos para el hombre, causando además un deterioro ambiental debido a que no son biodegradables (Michalakis y Renaud, 2009). El uso prolongado y sostenido de estos productos ha sido incapaz de erradicar a estas enfermedades, razón por la cual seguimos presenciando la aparición de brotes epidémicos como los del dengue o los ocasionados por el virus del Este del Nilo. La poca eficiencia mostrada por los insecticidas químicos ha conducido a la búsqueda y desarrollo de métodos alternativos para el control de los vectores. Un método que no daña al ambiente hace uso de ciertas cepas de bacterias, como son *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis (Bti)* y *Bacillus sphaericus*, las cuales son muy efectivas en el control de las larvas de los mosquitos y de otros dípteros. Además, el uso de esta tecnología presenta un alto nivel de seguridad tanto para la salud humana como para los insectos inofensivos (Wirth *et al.*, 2002).

#### 4.- Malaria

La malaria, también llamada paludismo, es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium*. Los parásitos son diseminados entre la población mediante la picadura de mosquitos del género *Anopheles* infectados con *Plasmodium*.

Según estimaciones de las Naciones Unidas, aproximadamente la mitad de la población mundial –unas 3,300 millones de personas- vive en riesgo de adquirir esta enfermedad, particularmente aquellos que viven en países en vías de desarrollo. Se calcula que unas 500 millones de personas se enferman de malaria al año, de las cuales 1 millón muere (Aly *et al.*, 2009). La mayoría de los casos y muertes se registran en el África sub-Sahariana, sin embargo, también están afectadas Asia, América Latina, Medio Oriente y algunas partes de Europa (WHO, 1996).

La especie *Anopheles gambiae* es la principal responsable de la transmisión de la malaria en África, mientras que *Anopheles albimanus* lo es en el Continente Americano. Se ha reportado que ambas especies han generado niveles altos de resistencia a los insecticidas químicos (Dzul *et al.*, 2007; Yadouleton *et al.*, 2010). Al igual que todos los mosquitos, los anophelinos atraviesan por cuatro etapas durante su ciclo de vida: huevo, larva, pupa y adulto (Figura 1). Las primeras tres etapas son acuáticas y tienen una duración de 5-14 días, dependiendo de la especie y la temperatura ambiente. El período de fase larvario está conformado por cuatro estadios, después de los cuales la larva sufre una metamorfosis a pupa. A partir de esta última, el mosquito adulto emerge. El mosquito adulto macho vive alrededor de una semana, alimentándose de néctar. Las hembras requieren además ingerir sangre (*hematofagia*) para el desarrollo de los huevos y viven entre 1 y 2 semanas.



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Anopheles ssp.*

Como ya se mencionó, el *Plasmodium* es un protozoo que provoca la malaria al ser transmitido por los mosquitos anofelinos a los vertebrados. Existen más de 150 especies de *Plasmodium* (*P*), de las cuales cuatro (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*) infectan al hombre. Las dos especies más comunes son *P. falciparum* y *P. vivax* (Escalante y Ayala, 1994).

a) *Plasmodium falciparum*.- Aunque presenta una distribución global, se le encuentra más comúnmente en África. La malaria cerebral es la complicación más grave de la enfermedad. En ésta, los glóbulos rojos infectados por el parásito se tornan adhesivos y se pegan en las paredes de los vasos capilares, entre otros los del cerebro, provocando que la víctima entre en coma. La anemia es la otra complicación producida por la destrucción de glóbulos rojos (Breman *et al.*, 2007).

b) *Plasmodium vivax*.- Esta especie es responsable del 25-40% de los casos anuales de malaria alrededor del mundo, afectando principalmente a Asia y América. Este plasmodio presenta la particularidad de mantener formas “durmientes” (*hipnozoitos*) en el



hígado, lo que provoca la recurrencia de la enfermedad. Se presentan episodios febriles repetitivos y debilitantes durante meses. Puede provocar anemia severa, aumento del tamaño del bazo (*esplenomegalia*), problemas respiratorios y coma (Bozdech *et al.*, 2008; Mueller *et al.*, 2009).

El *Plasmodium* atraviesa una serie de etapas morfológicamente distintas en el humano y en el mosquito. El parásito alterna entre etapas invasivas y etapas replicativas separadas por una sola fase de desarrollo sexual que media la transmisión del humano al vector anofelino (Hall *et al.*, 2005; Aly *et al.*, 2009).

Tras la picadura del mosquito, éste inocula el parásito presente en sus glándulas salivales en el tejido del huésped. En ese momento, el *Plasmodium* se encuentra en la fase de su ciclo conocida como esporozoito. Los esporozoitos pasan al torrente sanguíneo hasta que llegan a los hepatocitos. Allí se multiplican para dar lugar al esquizonte hepático, tras lo cual se rompe el hepatocito, apareciendo un nuevo estadio del *Plasmodium*, conocido como merozoito. En este momento se completa un primer ciclo asexual, en el que los merozoitos pueden reinfectar hepatocitos o regresar al torrente sanguíneo, donde penetran en los eritrocitos (Lobo y Kumar, 1998). En los eritrocitos, los merozoitos comienzan a alimentarse de hemoglobina, apareciendo entonces el trofozoito. Éste se multiplica en el interior de dichas células, formándose el esquizonte hemático. Una vez que el eritrocito se rompe y libera nuevos merozoitos, la mayoría de éstos continúan infectando nuevos eritrocitos, pero algunos se convierten en gametocitos (Lobo y Kumar, 1998). Si el individuo infectado es nuevamente picado por un mosquito, los gametocitos pasan al mosquito donde se diferencian en gameto masculino y gameto femenino. Posterior a la fertilización y a la generación de cigotos, éstos se convierten en oocinetos móviles y alargados que invaden la pared intestinal del mosquito, donde se desarrollan en ooquistes. Éstos crecen, se rompen y liberan una nueva generación de esporozoitos a la hemolinfa, los cuales viajan a las glándulas salivales del mosquito. Es en esta fase en la que el *Plasmodium* puede volver a ser inyectado en el huésped (Lobo y Kumar, 1998).

El tratamiento temprano de la malaria puede acortar su duración, prevenir complicaciones y evitar la mayoría de las muertes. El mejor tratamiento disponible es una terapia basada en artemisina (Eastman y Fidock, 2009). Sin embargo, el parásito ha desarrollado resistencia a este fármaco, lo que diezma los esfuerzos en el control de la malaria. La disponibilidad del genoma de *P. falciparum* ha permitido la identificación de antígenos potenciales que se expresan en diferentes etapas del ciclo de vida del parásito; sin embargo, no existe actualmente una vacuna disponible contra el *Plasmodium* (Gardner *et al.*, 2002; Todryk *et al.*, 2007). En noviembre del 2009 se inició el ensayo clínico Fase III de la vacuna denominada RTS,S desarrollada por la compañía GlaxoSmithKline Biologicals, la cual en los ensayos clínicos Fase II demostró tener una efectividad del 53% (<http://www.malariavaccine.org/>).

Debido a que no existen a la fecha alternativas a la artemisina que sean efectivas en el tratamiento de la malaria, el manejo de las poblaciones del vector es el principal componente en los programas de control de esta enfermedad (WHO, World Malaria Report: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241593199\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241593199_eng.pdf)). Aún cuando se ha hecho uso indiscriminado de insecticidas químicos contra mosquitos para el control de la malaria, no se han obtenido los resultados deseados, generando el desarrollo de resistencia a estos insecticidas. Otra estrategia seguida consiste en la ingeniería de mosquitos transgénicos ineficientes en la transmisión del *Plasmodio*, haciendo uso de la información genómica de *An. gambiae*; sin embargo, aún estamos lejos de llevar a cabo un control basado en organismos transgénicos (Holt *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2002).

A este respecto, se presenta la alternativa del control biológico de larvas de mosquitos haciendo uso de ciertas bacterias, especialmente *Bti* y *B. sphaericus*, las cuales producen toxinas insecticidas específicas a sus insectos blanco (Mittal, P.K., 2003). A la fecha no se ha reportado la generación de resistencia en mosquitos en campo tratados con *Bti* (Regis *et al.*, 2000). En cambio, se han seleccionado poblaciones de mosquitos resistentes a *B. sphaericus*, cuya actividad insecticida se debe a que sintetiza una toxina llamada Binaria (Nielsen-LeRoux *et al.*, 1995). Además, se ha demostrado que el uso de *Bti* mata de manera efectiva la larva del mosquito vector de la malaria en condiciones de

campo en el África sub-Sahariana, reduciendo la densidad de población del mosquito (Geissbühler *et al.*, 2009; Fillinger *et al.*, 2008).

La actividad insecticida de *Bti* se debe a la presencia en esta bacteria de las toxinas Cry y Cyt, las cuales pertenecen a la clase de toxinas formadoras de poro (TFP) (de Maagd *et al.*, 2001.; de Maagd *et al.*, 2003).

## **5.- Toxinas Formadoras de Poro**

Entre las toxinas producidas por bacterias, las toxinas formadoras de poro (TFP) representan la clase más amplia, totalizando el 30% de todas las toxinas bacterianas conocidas. La familia de las TFP está compuesta por varias subfamilias, que, a pesar de usar un modo de acción similar, presentan baja similitud de secuencia entre sí (Iacovache *et al.*, 2008).

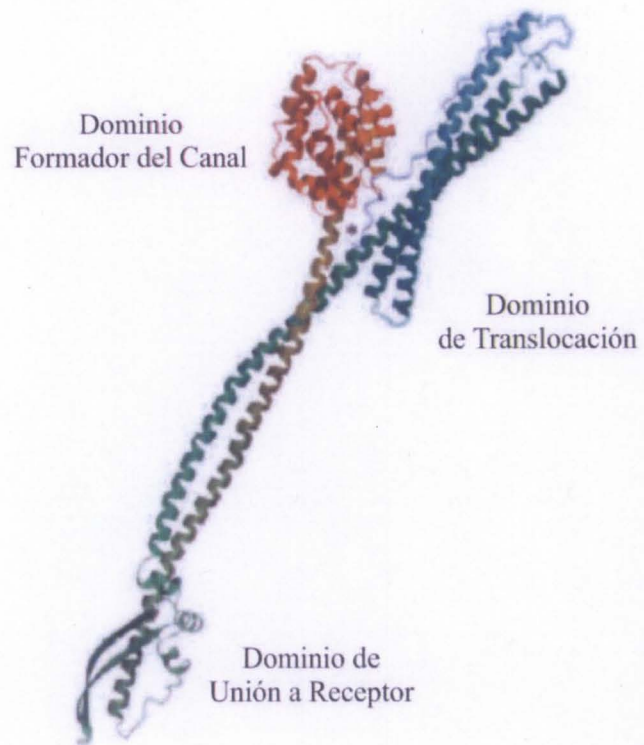
Una vez secretadas por la bacteria, las TFP difunden hacia la célula blanco, a la cual se unen a través de receptores específicos. Cabe aclarar que aún cuando se les designa como receptores de la toxina, en realidad son proteínas presentes en la membrana que llevan a cabo una función celular independiente de unir a la toxina. A la fecha se han identificado diferentes receptores de las TFP, entre los que se encuentran proteínas transmembranales, proteínas localizadas en balsas lipídicas y lípidos, los cuales proveen los sitios de unión de la toxina en la superficie celular. Posteriormente, la unión al receptor desencadena cambios conformacionales en las toxinas que les permiten insertarse en las membranas (Parker y Feil, 2005).

Las toxinas formadoras de poro se han clasificado en dos tipos, dependiendo de la estructura que les permite insertarse en la membrana. El poro formado por las  $\alpha$ -TFP contiene regiones de  $\alpha$ -hélices, mientras que en las  $\beta$ -TFP, éste se conforma por láminas  $\beta$  anfipáticas, las cuales se plegan formando una estructura de barril lo suficientemente hidrofóbica para que se lleve a cabo la inserción en la membrana (Iacovache *et al.*, 2008). La formación de poros en las membranas constituye una forma de ataque que provoca la

ruptura de éstas, pero que a la vez puede generar cambios en la composición iónica que la célula es capaz de sentir y montar una defensa ante los mismos. Estas respuestas involucran la activación de diferentes vías de transducción de señales y mecanismos celulares que les permiten reparar el daño en la membrana mediante la síntesis de lípidos (Aroian y van der Goot, 2007).

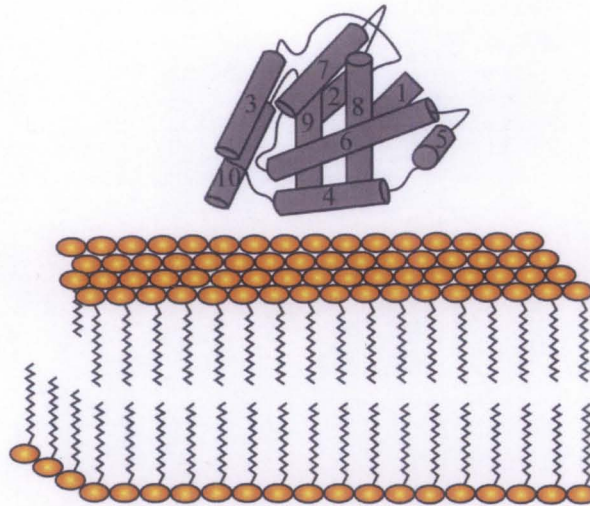
### 5.1.- $\alpha$ -TFP

A continuación se discutirá brevemente acerca de las características de las colicinas, toxinas producidas por *Escherichia coli*, como un ejemplo de las  $\alpha$ -TFP. Una vez que las colicinas se unen a receptores específicos, éstas son translocadas hacia el periplasma de la bacteria blanco. La estructura tridimensional de las colicinas está conformada por varios dominios. La colicina la puede ser dividida en tres dominios: el dominio de translocación, el cual está formado por tres  $\alpha$ -hélices, una de las cuales se extiende hacia el dominio de unión al receptor. Este último dominio está formado por una estructura de tallo y asa tipo  $\beta$ , que se estructura alrededor de la hélice C1. El dominio formador del poro, constituido por un haz de diez  $\alpha$ -hélices, el cual es un dominio globular con un núcleo hidrofóbico compuesto por una estructura de tallo y asa  $\alpha$ -helicoidal formado por las hélices 8 y 9 (Figura 2) (Wiener *et al.*, 1997). Para explicar la inserción de las colicinas en la membrana, se ha propuesto el “modelo de la sombrilla”, según el cual estas hélices se exponen por medio de una desnaturalización parcial del dominio formador del poro, un evento desencadenado por la variación del pH en la interfase de la membrana (Figura 3). El asa hidrofóbica del tallo-asa inicia la inserción en la bicapa lipídica seguida de una inserción espontánea del tallo-asa completo. La inserción en la membrana de estas hélices promovería la formación de un poro cerrado. La apertura del mismo depende, a su vez, de la inserción de las hélices adyacentes. Aunque es muy probable que se requiera la oligomerización de las toxinas, no existen pruebas definitivas al respecto, debido a que no se cuenta con una estructura de alta resolución de la configuración del poro (Parker y Feil, 2005).

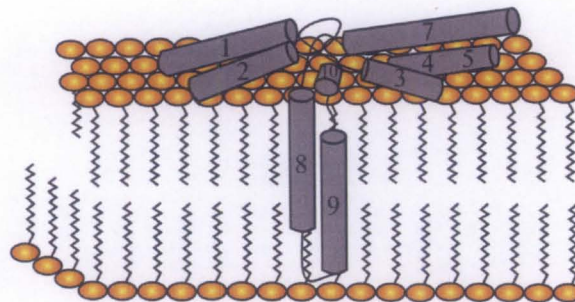


**Figura 2.** Estructura Cristalográfica de la Colicina Ia (tomado de Wiener *et al.*, 1997).

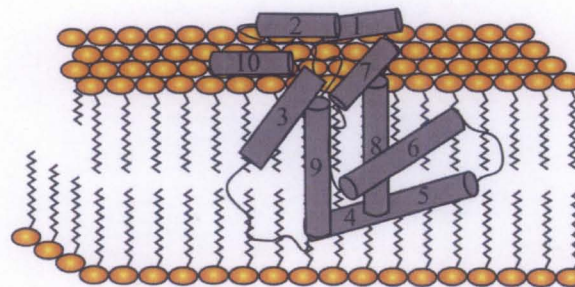
a)



b)



c)

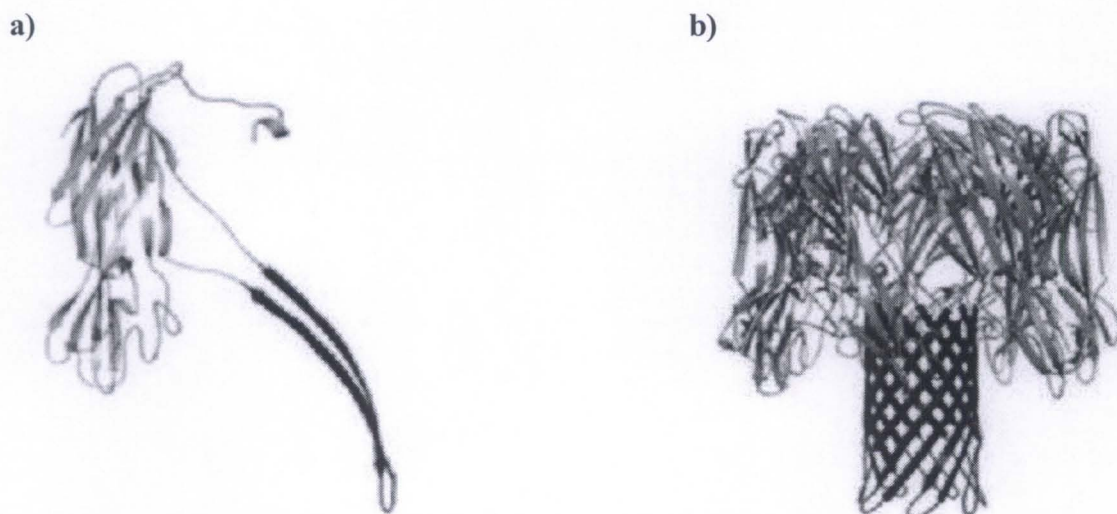


**Figura 3.** Modelo de la sombrilla para la inserción en la membrana del dominio formador del poro de la Colicina A. a) Aproximación de la toxina a la membrana. b) Conformación de sombrilla en el estado cerrado del canal, en el cual las hélices 8 y 9 se insertan en la membrana. c) Posible conformación del estado abierto del canal. Aunque este modelo asume que el canal es oligomérico, sólo se muestra un monómero para simplificar (tomado de Parker y Feil, 2005).



## 5.2.- $\beta$ -TFP

La  $\alpha$ -toxina producida por *Staphylococcus aureus* (también llamada  $\alpha$ -hemolisina) pertenece a esta familia. Se ha propuesto recientemente que la unión de la toxina a la membrana podría estar mediada por grupos de cabezas de fosfocolina, dentro de microdominios (Valeva *et al.*, 2006). Una vez en la membrana plasmática, la  $\alpha$ -toxina oligomeriza para formar un prepore soluble en agua. Un segundo cambio conformacional dá lugar a un barril tipo  $\beta$ , el cual es competente para insertarse en la membrana. La estructura de alta resolución del heptámero de la  $\alpha$ -toxina en su estado transmembranal fue resuelta por cristalografía de rayos X (Song *et al.*, 1996). La estructura muestra un complejo en forma de hongo y contiene tres dominios conformados principalmente de estructuras tipo  $\beta$  (Figura 4b) (González *et al.*, 2008). La parte superior de la estructura en forma de hongo consiste de un  $\beta$ -sandwich y un lazo en el extremo amino terminal que provee enlaces adicionales entre los diferentes monómeros. Debajo del dominio superior se localiza un dominio en forma de aro próximo a la cara externa de la membrana plasmática. Inmediatamente debajo del dominio en forma de aro se encuentra el dominio del tallo, el cual atraviesa la membrana y consiste de un barril tipo  $\beta$  formado por 14 láminas, de las cuales cada monómero contribuye con una estructura de tallo y asa tipo  $\beta$ , cuyas láminas corren en sentido antiparalelo (Song *et al.*, 1996; González *et al.*, 2008).



**Figura 4.** Estructura cristalográfica de la  $\alpha$ -toxina de *Staphylococcus aureus*. a) Monómero, b) heptámero (tomado de González *et al.*, 2008).

## 6.- *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es una bacteria de gran importancia económica ya que sintetiza Toxinas Formadoras de Poro que han sido utilizadas ampliamente para el control tanto de plagas que atacan cultivos de importancia agronómica como de vectores de enfermedades de impacto en el humano. *Bt* es un miembro del grupo de *Bacillus cereus*, que también incluye a *Bacillus anthracis* y *Bacillus mycooides* (de Maagd *et al.*, 2003). En particular, *Bt* se distingue de otros miembros de *B. cereus* por su capacidad de producir proteínas insecticidas, también llamadas  $\delta$ -endotoxinas, en forma de inclusiones cristalinas que se componen de las toxinas Cry y Cyt. Estas toxinas son muy específicas de su insecto blanco, son inocuas para los humanos y son biodegradables. Estas características han posicionado a *Bt* como una alternativa viable para el control de plagas en la agricultura y de vectores de enfermedades para el humano (Aronson y Shai, 2001).

Las proteínas Cry pertenecen al grupo de toxinas  $\alpha$ -TFP y presentan actividad contra insectos lepidópteros, dípteros, coleópteros, himenópteros, homópteros, ortópteros y malófagos, así como nemátodos y protozoarios (de Maagd *et al.*, 2001). En contraste, las toxinas Cyt pertenecen a las toxinas  $\beta$ -TFP y se encuentran principalmente en cepas de *Bt* que son activas contra dípteros (Guerchicoff *et al.*, 2001).

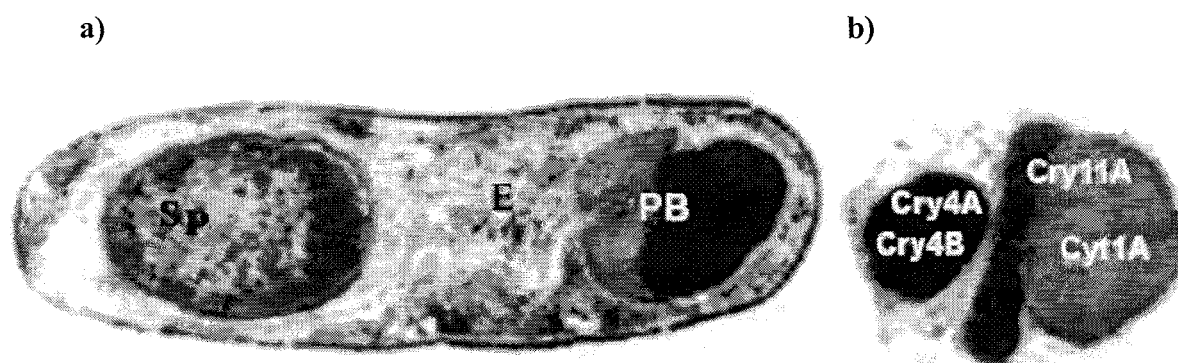
El ciclo de vida de *Bt* cuenta con dos fases principales, la de crecimiento vegetativo, en donde las bacterias se duplican por bipartición cada 30-90 minutos y la fase de esporulación, que es un programa de diferenciación de bacteria a espora que consta de siete fases y que se dispara cuando *Bt* se encuentra en limitación de nutrientes. La *fase I* (7 horas) es aquella donde se induce la formación del filamento axial de *Bt*. En la *fase II* (de las 7 a las 8 horas) se forma el septo espora de división asimétrica que involucra mesosomas. En la *fase III* (de las 8 a las 9 horas) dá inicio la síntesis del cristal insecticida, se presentan cambios a nivel de la membrana y el citoplasma, además de que se forma la espora. En las fases *IV a VI* (de las 9 a las 12 horas), se forma el exosporio, la pared celular primordial, la corteza y las capas de protección de la espora. Por último, en la *fase VII* (evento posterior a las 12 horas), se dá la maduración de la espora y la síntesis de enzimas



líticas que liberan a los cristales insecticidas. Como mencionamos antes, durante las fases III a VI del ciclo de esporulación, *Bt* es capaz de producir uno o más cristales paraesporales de carácter proteínico ó  $\delta$ -endotoxinas, las proteínas Cry y Cyt, las cuales son consideradas dentro del gran grupo de Toxinas Formadoras de Poro (TFP) (de Maagd *et al.*, 2003).

### 6.1.- *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis*

El cristal producido por *Bti* se compone principalmente de cuatro toxinas Cry, como son Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa y dos toxinas Cyt, Cyt1Aa y Cyt2Ba, las cuales dan lugar a tres tipos diferentes de inclusiones cristalinas que se ensamblan en un cuerpo paraesporal esférico (Figura 5) (Federici *et al.*, 2003). Las toxinas Cry y Cyt de *Bti* están codificadas en un plásmido llamado pBtoxis (Berry *et al.*, 2002). En particular, se debe destacar el papel de la toxina Cyt1Aa, la cual, al sinergizar la actividad de las toxinas Cry, se cree que ha evitado la aparición de resistencia a *Bti* en dípteros, ya que a pesar de que en condiciones de laboratorio se han seleccionado poblaciones de *Culex quinquefasciatus* resistentes a Cry4Aa, Cry4Ba ó Cry11Aa, en campo no se han podido seleccionar mosquitos resistentes a toxinas Cry en presencia de Cyt1Aa (Wirth *et al.*, 1997).



**Figura 5.** *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis*. a) *Bti* en fase de esporulación; b) Cuerpo parasporal típico que contiene inclusiones de toxinas individuales. Sp, Espora; E, exosporio; PB, Cuerpo paraesporal (tomado de Federici *et al.*, 2003).

## 6.2.- Clasificación y Nomenclatura de las $\delta$ -endotoxinas

Las  $\delta$ -endotoxinas de *Bt* comprenden dos familias, las toxinas Cry y las toxinas Cyt. La nomenclatura de las toxinas Cry y Cyt se basa en la identidad de secuencia primaria entre las diferentes proteínas integrantes de cada familia. Esta clasificación utiliza cuatro rangos representados por números arábigos, letras mayúsculas, letras minúsculas y números, estableciendo límites de identidad que marcan las diferencias entre categorías. De esta manera, el número arábigo que lleva el nombre de la toxina se designa con el primer carácter que corresponde a una identidad en secuencia primaria de hasta el 45%; el segundo carácter cataloga a las proteínas con una letra mayúscula y corresponde a identidades que van del 45% al 78%; el tercer carácter asigna una letra minúscula y corresponde a identidades del 78 al 95%; y el último carácter incluye un número arábigo al final de la nomenclatura indicando más del 95% de identidad (Crickmore *et al.*, 1998).

Aunque este sistema de clasificación no toma en cuenta la selectividad de las toxinas Cry hacia los diversos órdenes de insectos, algunos subgrupos de toxinas Cry muestran una coincidencia entre la similitud en secuencia y su especificidad. Por ejemplo, las toxinas tipo Cry1 son activas principalmente contra insectos lepidópteros, mientras que las toxinas Cry3 son tóxicas contra coleópteros. En contraste, las toxinas Cry activas contra insectos dípteros (como la Cry1C, la Cry2Aa, las toxinas tipo Cry4 y las toxinas tipo Cry11), han demostrado pertenecer a diferentes subgrupos, debido a que presentan una baja similitud en secuencia (Crickmore *et al.*, 1998).

## 7.- Toxinas Cry

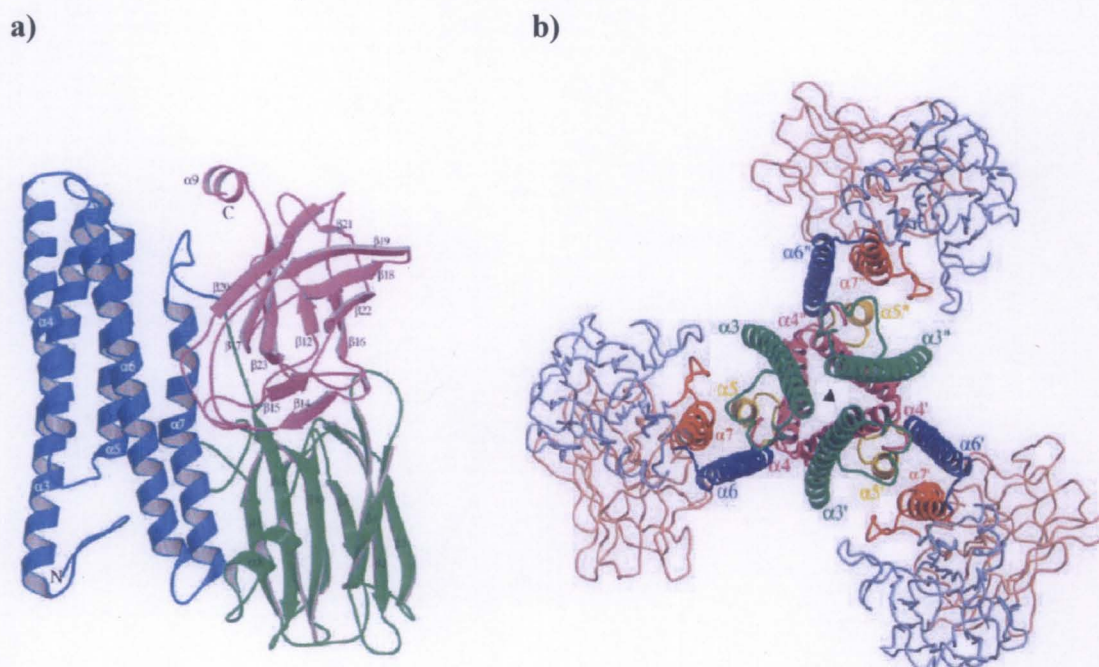
Las toxinas Cry se encuentran formando cristales protéicos en *Bt*. Una vez que son ingeridas por los insectos blanco, los cristales se solubilizan al ser sometidos al ambiente alcalino y reductor del intestino. Ya solubilizadas, las toxinas sufren una activación proteolítica por enzimas presentes en el tracto digestivo del insecto. Durante el proceso de activación son eliminadas la región amino-terminal y el carboxilo-terminal de las protoxinas (Schnepf *et al.*, 1998).

## 7.1.- Estructura de las toxinas Cry

Las toxinas Cry son moléculas globulares formadas por tres dominios. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de estas toxinas revela la presencia de cinco bloques conservados. Algunos de estos bloques no están presentes en ciertos subgrupos de estas toxinas. Estos bloques se encuentran separados por secuencias muy variables en longitud entre las diferentes toxinas Cry. El bloque 1 está localizado en la hélice central del dominio I. Este bloque comprende la hélice 5 que ha sido implicada en la formación del poro, papel que podría explicar su grado de conservación. El bloque 2 incluye la hélice 7 del dominio I y la primera lámina- $\beta$  del dominio II. Estas dos estructuras comprenden la región de contacto entre los dos dominios. Las interacciones entre estos dos dominios podrían ser importantes durante los cambios de orientación del dominio I con respecto al resto de la molécula una vez que la toxina se une a su receptor, o bien, en mantener a la proteína en su estado globular durante la solubilización y activación. Cada uno de los bloques 3, 4 y 5 se localiza en cada una de las tres láminas ocultas del dominio III. El bloque 3 se localiza en el límite entre los dominios II y III. Las dos argininas centrales del bloque 4 podrían estar involucradas en la formación del cristal y el bloque 5 está al final del dominio III (revisado por de Maagd *et al.*, 2001).

A la fecha se ha resuelto la estructura cristalográfica de rayos X de las toxinas Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4Aa y Cry4Ba (revisado por Pigot y Ellar., 2007). A pesar de que, como se mencionó con anterioridad, el porcentaje de identidad en secuencia entre estas proteínas es bajo, la estructura tridimensional de las mismas es muy similar. Dicha estructura está conformada por tres dominios (Figura 6a). En el extremo amino terminal, el dominio I está formado por siete  $\alpha$ -hélices, de las cuales la hélice 5 es muy hidrofóbica y forma el centro del dominio. El resto de  $\alpha$ -hélices de este dominio constituyen la pared externa que protege a la hélice 5 del medio acuoso, son anfipáticas y lo suficientemente largas para atravesar la membrana. El dominio II consiste de tres láminas- $\beta$  antiparalelas agrupadas alrededor de un centro hidrofóbico. Este dominio representa la región más divergente de la estructura entre las toxinas Cry y está involucrado en la unión de la toxina al receptor (de Maagd *et al.*, 2001). Finalmente, el dominio III se compone de

dos láminas  $\beta$ -antiparalelas y participa también en la unión al receptor (de Maagd *et al.*, 2001). Se requiere un cambio conformacional importante para transformar la toxina Cry soluble en una estructura capaz de insertarse en la membrana (Figura 6b). Se ha postulado que dicho cambio conformacional podría deberse a la exposición de una hélice tallo-asa relativamente no polar del dominio I, lo cual podría permitir entonces la penetración de la membrana. Las hélices del dominio I de las toxinas Cry son muy anfipáticas, pero la región del asa  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5 es la más hidrofóbica. El “modelo de la sombrilla” para la formación del poro generado por las toxinas Cry sugiere que un par de hélices, probablemente la  $\alpha$ 4 y  $\alpha$ 5 se insertan en la membrana. El resto de las hélices se reestructurarían sobre la superficie de la membrana al igual que los rayos de una sombrilla.



**Figura 6.** a) Estructura tridimensional de la toxina Cry4Ba. Se señalan los tres dominios estructurales: el dominio I (azul), el dominio II (verde) y el dominio III (morado). b) Estructura del posible oligómero de la toxina Cry4Ba formado por tres monómeros. Se señalan las hélices del dominio I involucradas en la formación del oligómero: la hélice  $\alpha$ -5 en color amarillo, la hélice  $\alpha$ -3 en verde, la  $\alpha$ -4 en fucsia y  $\alpha$ -6 en azul índigo (tomado de Boonserm *et al.*, 2005).

## 7.2.- Receptores de las toxinas Cry

Los receptores de las toxinas Cry que se han identificado a la fecha pertenecen a dos diferentes clases de moléculas, las cuales son proteínas y glicolípidos. La unión de las toxinas Cry a sus receptores se puede dar a través de varias regiones, las cuales interactúan ya sea con proteínas o con carbohidratos. Esto les ha permitido adaptarse a interactuar con diferentes tipos de receptores, entre los que se encuentran a la aminopeptidasa N, la caderina, la fosfatasa alcalina y los glicolípidos.

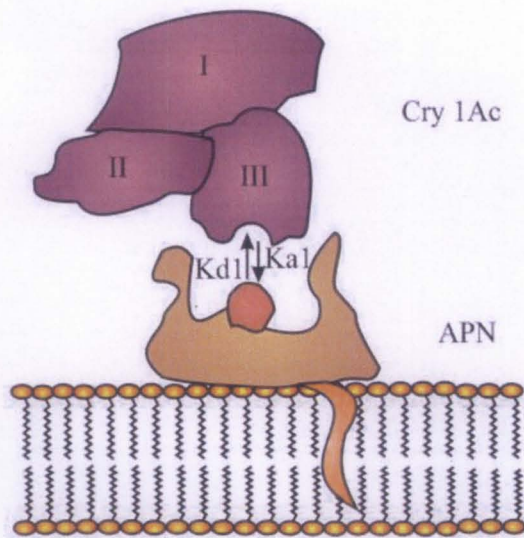
### 7.2.1- Aminopeptidasa-N

Las Aminopeptidasas N (APN) son ectoenzimas dependientes de  $Zn^{+}$ , que están involucradas en la digestión de las proteínas en los insectos. Las APNs llevan a cabo la hidrólisis de aminoácidos neutros a partir del extremo amino terminal de los péptidos que usan como sustratos (revisado por Pigot y Ellar, 2002). Estas proteínas presentan un péptido señal en la región N-terminal y se anclan a la membrana mediante glicosilfosfatidilinositol (GPI).

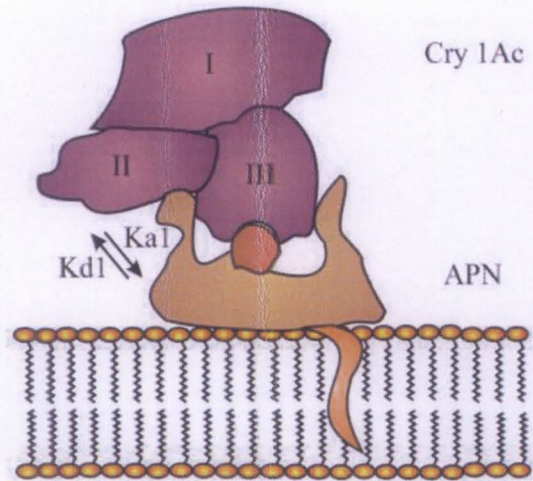
Se ha propuesto que las APNs de lepidópteros funcionan como proteínas de unión de las endotoxinas insecticidas de *Bt* (Sangadala *et al.*, 1994; Masson *et al.*, 1995; Gill y Ellar, 2002; Rajagopal *et al.*, 2002; Herrero *et al.*, 2005). Según estudios cinéticos de la interacción, la APN de *Limantria dispar* parece tener más de un sitio de unión a la toxina Cry1Ac. En este caso, el dominio III de la toxina inicia esta interacción mediante el reconocimiento de un residuo de N-acetil-galactosamina (GalNAc) presente en la APN (Figura 7a). Posteriormente, se lleva a cabo una interacción de mayor afinidad entre el dominio II de la toxina y la APN (Figura 7b) (Jenkins *et al.*, 2000).



a)



b)



**Figura 7.** Modelo de unión de la toxina Cry1Ac a la APN de *Limantria dispar* a través de dos sitios. a) Se postula que la primer interacción es por medio del dominio III de la toxina y de un residuo de GalNac, señalado en naranja. b) Posteriormente, el dominio II de la toxina se une a un segundo sitio en la APN.

Un dato más preciso acerca de la participación de la APN como receptor consistió en expresar la proteína del lepidóptero *Manduca sexta* en el intestino medio del díptero *Drosophila melanogaster*, que es un insecto que normalmente no es susceptible a la toxina Cry1Ac. Las larvas transgénicas de *Drosophila* que expresaron a la APN de *M. sexta* se tornaron susceptibles a Cry1Ac (Gill y Ellar, 2002). Estos datos cobran mayor fuerza al tomar en cuenta que se genera resistencia a la toxina Cry1C en larvas de *Spodoptera litura* al silenciar la expresión de la APN (Rajagopal *et al.*, 2002).

El estudio de los receptores de las toxinas Cry con actividad contra dípteros ha dejado ver que la APN también es una molécula de unión específica a estas toxinas, como es el caso de la Cry11Ba en *Anopheles quadrimaculatus* y la Cry11Ba así como la Cry11Aa en larvas de *Aedes aegypti* (Abdullah *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009b).

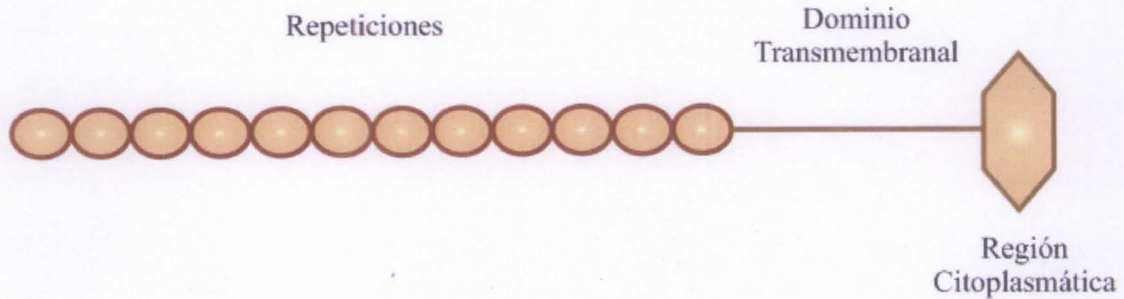
### 7.2.2.- Caderina

Las proteínas caderinas están involucradas en una gran variedad de funciones, incluyendo la adhesión celular, la organización del citoesqueleto y la morfogénesis (Angst *et al.*, 2001). Estas proteínas se caracterizan por la presencia de dominios repetidos de aproximadamente 110 aminoácidos de largo, los cuales contienen motivos de unión a calcio. Las caderinas son proteínas glicosiladas y normalmente están ancladas a la membrana por un dominio transmembranal. Estas proteínas se localizan principalmente en uniones adherentes que participan en la unión célula-célula (Angst *et al.*, 2001).

Se ha reportado que algunas proteínas que presentan similitud a las caderinas, a las cuales se les nombra como proteínas tipo caderina, interactúan con las toxinas Cry. Éstas muestran una localización diferente a la habitual de las caderinas, ya que se encuentran en la membrana apical de las células epiteliales columnares del intestino medio. La primera proteína tipo caderina que se demostró que interactúa con las toxinas Cry es la proteína llamada Bt-R1, la cual es una glicoproteína de 210-kDa identificada en *M. sexta* (Vadlamudi *et al.*, 1993). El análisis de la secuencia de la proteína predice un dominio extracelular conformado por un péptido señal y 12 repeticiones características de las caderinas; además, presentan una región transmembranal y un pequeño dominio citoplasmático (Figura 8) (Vadlamudi *et al.*, 1995). En particular, se encontró que la interacción entre la Cry1A y Bt-R1 está mediada por las asas apicales del dominio II de la toxina con las repeticiones 7, 11 y 12 de Bt-R1 (Gómez *et al.*, 2002a; Dorsch *et al.*, 2002; Hua *et al.*, 2004). La participación de las proteínas tipo caderina en la toxicidad por Cry1Ab es un hecho aceptado, ya que se ha visto que la expresión heteróloga de Bt-R1 en células en cultivo torna a éstas susceptibles a la toxina (Dorsch *et al.*, 2002; Hua *et al.*, 2004).

Se ha propuesto que las proteínas tipo caderina podrían ser receptores de las toxinas Cry que tienen actividad contra dípteros, ya que se ha demostrado que son proteínas que unen de manera específica a la toxina Cry4Ba en *An. gambiae* (Hua *et al.*, 2008). En el caso

de *Ae. aegypti*, un fragmento de caderina que va del repetido 7 al 11 se une a Cry11Aa a través de las asas apicales del dominio II de esta toxina (Chen *et al.*, 2009a).



**Figura 8.** Modelo de la estructura de Bt-R1, basado en la organización en dominios de las proteínas de la superfamilia de las caderinas. Los números indican las regiones de unión a la toxina Cry1A. También se representa el dominio transmembranal así como la región citoplasmática.

### 7.2.3.- Fosfatasa Alcalina

Las Fosfatasas Alcalinas (FAs) son fosfohidrolasas que constituyen una familia pequeña y muy conservada de metaloenzimas de superficie celular (Eguchi, M., 1995). Muchas de ellas son glicoproteínas ancladas mediante GPI, localizadas preferencialmente en balsas lipídicas. Las FAs están constituidas por varias subunidades y requieren de cationes divalentes para su actividad. Se les encuentra a lo largo del intestino medio y en los túbulos de Malpigio en las larvas de los insectos y en los embriones. Se ha propuesto que las FAs participan en la absorción activa de metabolitos (Eguchi, M., 1995).

En el lepidóptero *Heliothis virescens* la FA se identificó como receptor de Cry1Ac. La unión entre la FA y la Cry1Ac parece depender de la presencia de GalNAc. Un hecho que marca la relevancia de esta proteína en la toxicidad es que los niveles de expresión de FA se encuentran reducidos en una cepa resistente a la toxina Cry1Ac (Jurat-Fuentes y Adang, 2004). En el caso de los dípteros, se ha propuesto que la FA es el receptor de las



toxinas Cry11Aa y Cry11Ba en *Ae. aegypti* y en *An. gambiae*, respectivamente (Fernández *et al.*, 2006; Hua *et al.*, 2009). En el caso particular de *Ae. aegypti*, se reportó que la Cry11Aa se une a través del dominio II y el dominio III a dos sitios diferentes de la FA (Fernández *et al.*, 2009).

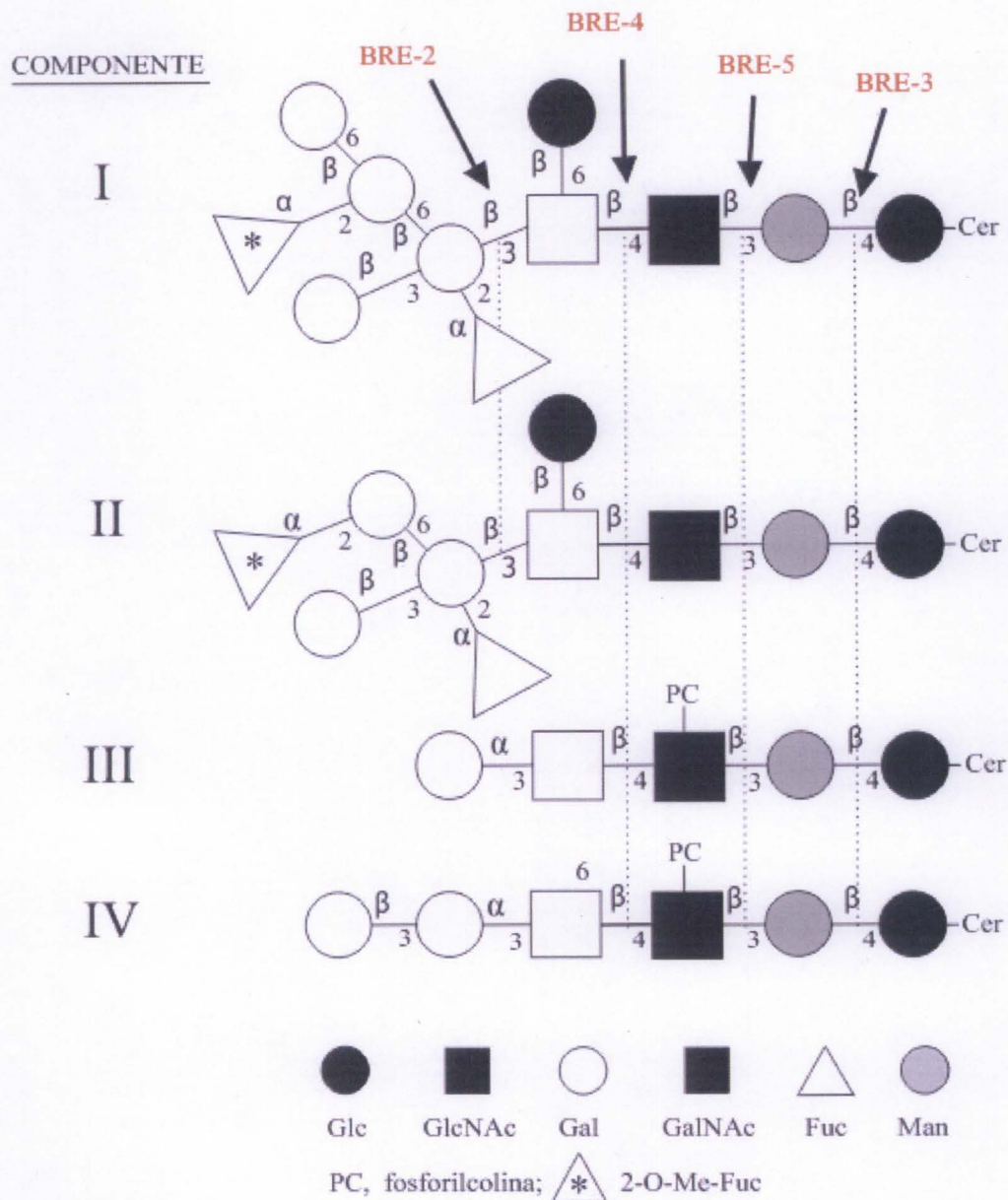
#### 7.2.4.- Glicosfingolípidos

Los glicolípidos son lípidos modificados por la adición de moléculas de carbohidratos. La adición de los carbohidratos a los fosfolípidos está controlada por enzimas del tipo glicosiltransferasas (van Meer *et al.*, 2008). Entre los glicolípidos se encuentran los glicosfingolípidos, los cuales se caracterizan por contener en su estructura una molécula de ceramida. La ceramida, a su vez, está compuesta por una molécula de esfingosina y un ácido graso de cadena larga unido mediante un enlace amida. Los glicolípidos se localizan principalmente en la membrana celular. Su papel fisiológico es la procuración de energía y como marcador de reconocimiento celular.

La evidencia directa de la participación de los glicosfingolípidos como receptores de las toxinas Cry fue posible gracias a la caracterización de cepas de *Caenorhabditis elegans* resistentes a Cry5Ba (Griffitts *et al.*, 2005). Mediante genética reversa, se identificaron cuatro genes que pueden restaurar la susceptibilidad a la toxina, los cuales se denominaron los genes *bre* (*B. thuringiensis* toxin resistant). El primer gene caracterizado, *bre-5*, es un miembro de la familia 1,3-galactosiltransferasa (Griffitts *et al.*, 2001). Posteriormente, se caracterizaron los genes *bre-2*, *bre-3* y *bre-4*. El gene *bre-2* codifica para una posible 1,3-glicosiltransferasa. A su vez, los genes *bre-4* y *bre-3* codifican para la enzima 1,4-N-acetilgalactosaminiltransferasa y para una glicosiltransferasa, respectivamente (Griffitts *et al.*, 2003).

Se ha observado que la unión de la toxina al glicosfingolípidos está mediada por un carbohidrato presente en el tetrasacárido central GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Man $\beta$ 1-4Glc. Este tetrasacárido está conservado tanto en nemátodos como en insectos. En su síntesis participan las enzimas de la vía BRE (Griffitts *et al.*, 2005). De acuerdo a las actividades de

estas enzimas y a las estructuras de sus productos, se ha postulado que las enzimas BRE actúan en el siguiente orden en la síntesis de glicolípidos, primero BRE-3, luego BRE-5, BRE-4 y finalmente BRE-2 (Figura 9).



**Figura 9.-** Estructura de los glicolípidos sintetizados por los productos de los genes *bre*. Las flechas y las líneas punteadas señalan los enlaces glicosídicos posiblemente catalizados por las enzimas BRE. Glc, glucosa; GlcNAc, N-acetilglucosamina; Gal, galactosa; GalNAc, N-acetilgalactosamina; Fuc, fucosa; Man, manosa; 2-O-Me-Fuc, 2-orto-metil fucosa; Cer, ceramida (tomado de Griffiths *et al.*, 2005).

### **7.3.- Respuestas celulares inducidas por la exposición a las toxinas Cry**

#### **7.3.1.- Formación de poros en la membrana celular**

La toxicidad de las proteínas Cry es inducida por la formación de poros en la membrana apical de la microvellosidad del intestino de los insectos blanco (Knowles *et al.*, 1989). Para explicar el mecanismo de toxicidad de las proteínas Cry, se tomaron en cuenta los datos que se tienen sobre el modo de acción de la toxina Cry1A, la cual interactúa de manera secuencial con dos receptores presentes en el intestino de *M. sexta*, llamados Bt-R1 y APN (Bravo *et al.*, 2004).

La primera interacción de la toxina Cry1Ab tiene lugar con el receptor Bt-R1, el cual se localiza en la porción de la membrana no asociada a balsas lipídicas (Zhuang *et al.*, 2002). Esta unión promueve un corte proteolítico en el extremo N-terminal de la hélice  $\alpha$ -1 del dominio I de Cry1Ab. Este corte expone regiones hidrofóbicas de la toxina, favoreciendo la formación de un pre-poro, el cual se ha demostrado que es competente para insertarse en la membrana (Gómez *et al.*, 2002b; Rausell *et al.*, 2004).

La segunda interacción tiene lugar entre el pre-poro y la APN, la cual se localiza en las balsas lipídicas y está anclada a la membrana mediante GPI (Zhuang *et al.*, 2002). Se sabe que en la unión con la APN participan los dominios II y III de la toxina. La interacción con el dominio II es del tipo proteína-proteína, mientras que la interacción con el dominio III utiliza un residuo de GalNac presente en la APN (Jenkins *et al.*, 2000). Se cree que la unión del pre-poro a la APN resulta en un cambio conformacional que produce una estructura más flexible que facilita su inserción en la membrana (Figura 10b) (Bravo *et al.*, 2004).

#### **7.3.2.- Estimulación de la Adenilato Ciclasa y activación de la Proteína Cinasa A**

También se ha reportado que la unión de la toxina Cry1Ab a BtR1 induce la activación de una vía de señalización que involucra la estimulación de la proteína G ( $G_{\alpha s}$ ) y de la adenilato ciclasa (AC), con un incremento en los niveles de AMPc y la activación de la Proteína Cinasa A (PKA) (Figura 10a) (Zhang *et al.*, 2006).

El incremento en los niveles intracelulares de AMPc es un marcador de activación de vías de transducción de señales que pueden promover la muerte celular o proteger a la célula de la muerte, dependiendo del tipo celular o del estímulo desencadenador. El efector corriente abajo más común del AMPc es la PKA. Una vez activada la PKA, ésta altera los efectores corriente abajo que a su vez desestabilizan el citoesqueleto y los canales iónicos en la membrana celular. Tal deterioro de la integridad estructural y funcional de la célula promueve la muerte celular (Zhang *et al.*, 2006).

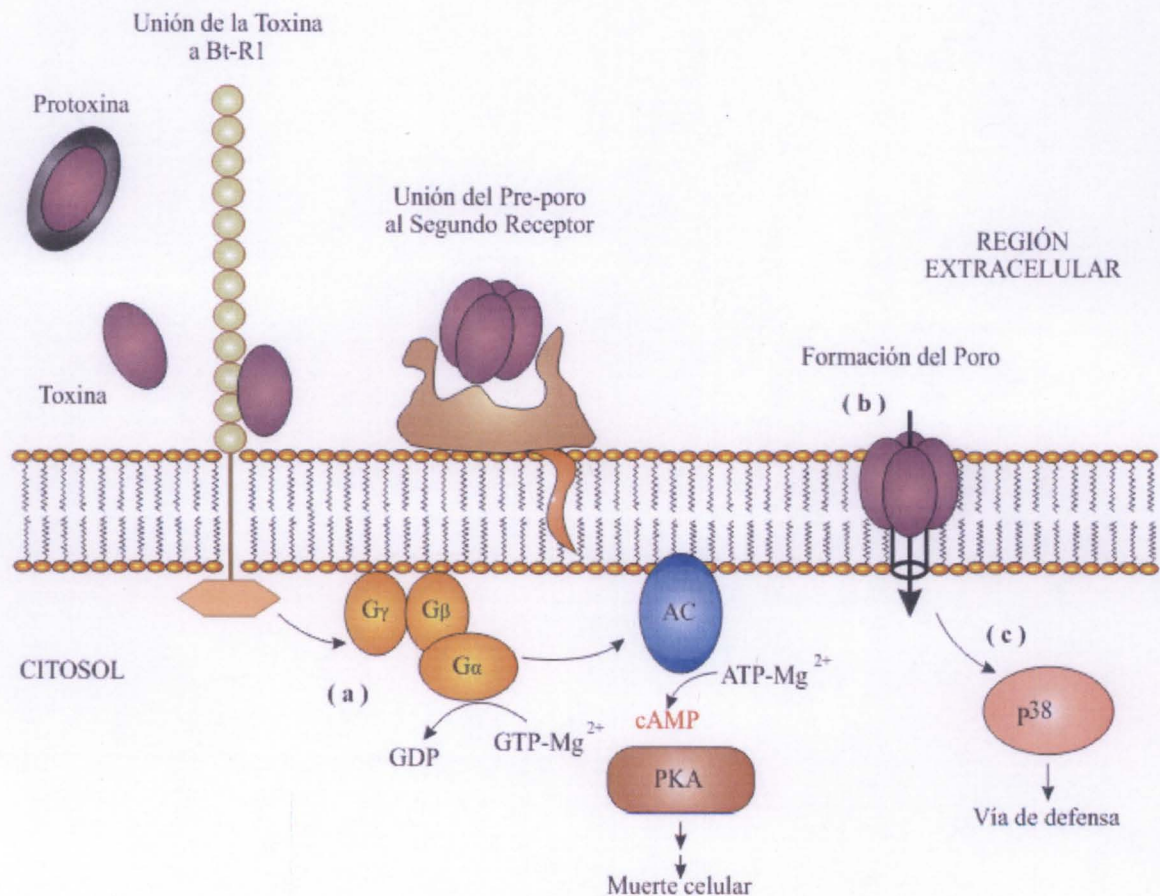
Los cambios citológicos ocasionados por la unión de Cry1Ab a Bt-R1 son el incremento en el tamaño de las células y su lisis, lo cual ocurre entre 30 y 40 minutos después de la exposición a la toxina. Estos efectos son muy similares a los asociados con oncosis y diferentes a los descritos para la muerte celular apoptótica. Los cambios inducidos por Cry1Ab pueden ser interrumpidos inhibiendo la vía de señalización AC/PKA (Zhang *et al.*, 2006).

### **7.3.3.- Transducción de señales**

Un proceso desencadenado por la exposición a la toxina Cry5B consiste en la inducción de las vías de p38 proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) y la JUNK (c-Jun N terminal-like) MAPK (Figura 10c) (Huffman *et al.*, 2004). La eliminación de ambas vías revela cuan importantes son éstas para montar una defensa en contra de los efectos de la toxina, ya que los animales mutantes presentan una hipersensibilidad a dosis bajas y crónicas de la toxina, así como hipersensibilidad a dosis altas pero administradas por breves lapsos.

Además, se identificaron dos blancos de la vía p38 MAPK, llamados *ttn-1* y *ttn-2*. La interferencia de *ttn-1* y *ttn-2* generó hipersensibilidad a la toxina, lo que corrobora la participación de la vía p38 MAPK en la defensa celular a las toxinas Cry (Huffman *et al.*, 2004). En el caso del gene *ttn-1* se propone que pudiera formar parte de un mecanismo que le ayudaría a la célula a recuperar su balance osmótico, dado que el producto codificado por este gene presenta similitud a proteínas que transportan cationes (Huffman *et al.*, 2004).

Otra vía activada por p38 inducida por la presencia de la toxina es la vía de respuesta a proteínas desnaturalizadas del retículo endoplásmico (UPR por sus siglas en inglés), la cual representa una respuesta a estrés presente en las células eucarióticas para generar un balance entre el proceso de la síntesis de proteínas y el doblamiento de las mismas (Bischof *et al.*, 2008). Una prueba de la participación de esta vía es el hecho de que si se inactiva ésta, da por resultado la generación de gusanos hipersensibles a la toxina Cry.





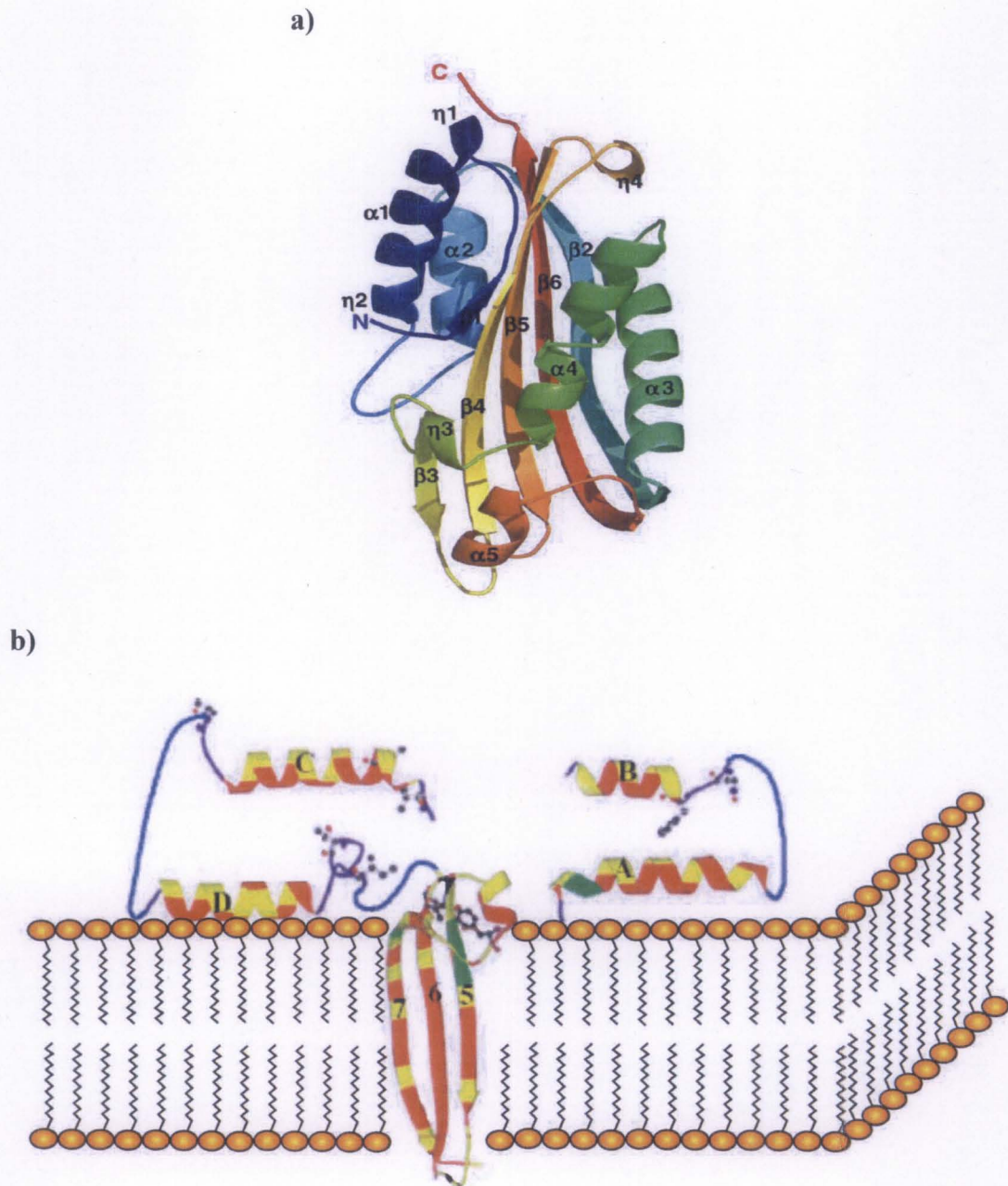
**Figura 10.** Respuestas celulares inducidas por la exposición a las toxinas Cry. La protoxina se solubiliza en el lumen del intestino del insecto y posteriormente se activa mediante proteasas del intestino medio, dando lugar a la toxina, la cual se une a su primer receptor, Bt-R1. Esta interacción induce una vía de señalización intracelular que involucra proteínas G y a la Adenilato Ciclasa (AC), promoviendo la producción de cAMP intracelular y la activación de la Proteína Cinasa A (PKA), provocando la muerte celular (inciso a) (Zhang *et al.*, 2006). Por otro lado, la interacción entre la toxina y su primer receptor, Bt-R1, además de activar la vía de PKA, dá lugar a la formación de un pre-poro. El pre-poro a su vez se une a un segundo receptor anclado mediante GPI a la membrana. Esta interacción induce la formación de una estructura que al insertarse en la membrana, forma poros que permiten la entrada y salida de iones, generando un desbalance osmótico (inciso b). Adicionalmente, la formación del poro activa a la vía p38 MAPK, involucrada en la defensa contra las TFPs (inciso c) (Bischof *et al.*, 2008).

## 8.- Toxinas Cyt

Las toxinas Cyt están presentes en la inclusión paraesporal de *Bti* junto con las toxinas Cry. Una vez que las toxinas Cyt son ingeridas por los insectos blanco, los cristales se solubilizan al ser sometidos al ambiente alcalino y reductor del intestino. Ya solubilizadas, las toxinas sufren una activación proteolítica por enzimas presentes en el tracto digestivo del insecto. Durante el proceso de activación son eliminadas la región amino-terminal y el carboxilo-terminal de las protoxinas generando una forma de 22 a 25 kDa (Li *et al.*, 1996).

### 8.1.- Estructura de las toxinas Cyt

Las  $\delta$ -endotoxinas Cyt son toxinas citolíticas con actividad contra insectos dípteros. Las toxinas Cyt comprenden dos familias estrechamente relacionadas, las Cyt1 y las Cyt2 (Li *et al.*, 1996). A la fecha, se tiene resuelta la estructura cristalográfica de Cyt2Aa (Li *et al.*, 1996) y Cyt2Ba (Cohen *et al.*, 2008). Su estructura se compone de un solo dominio de arquitectura  $\alpha/\beta$  que comprende dos capas externas de estructuras de tallo y asa  $\alpha$ -helicoidales alrededor de una lámina  $\beta$ . La lámina  $\beta$  está formada de seis hebras  $\beta$  antiparalelas ( $\beta 1-\beta 6$ ), flanqueadas por una capa de  $\alpha$ -hélices compuesta por un costado por las hélices  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  y por el otro costado por las hélices  $\alpha 3-\alpha 5$  (Figura 11a) (Konit y Ellar, 1994; Cohen *et al.*, 2008).



**Figura 11.** Estructura tridimensional de la toxina Cyt2 (a) soluble y (b) insertada en membrana. Las láminas  $\beta$ -5,  $\beta$ -6 y  $\beta$ -7 se insertan en la membrana y forman un oligómero con láminas similares de otros monómeros de Cyt para formar un poro del tipo barril- $\beta$ . (tomado de Cohen, *et al*, 2008 (a) y Promdonkoy y Ellar, 2005 (b), respectivamente).

Todas las toxinas Cyt reportadas a partir de diferentes subespecies de *B. thuringiensis* muestran alta identidad a nivel de secuencia de aminoácidos en las  $\alpha$ -hélices y en las láminas- $\beta$ , lo cual hace suponer que todas ellas presentan una estructura y función similar (Guerchicoff *et al.*, 2001; Juárez-Pérez, 2002; Li *et al.*, 1996).

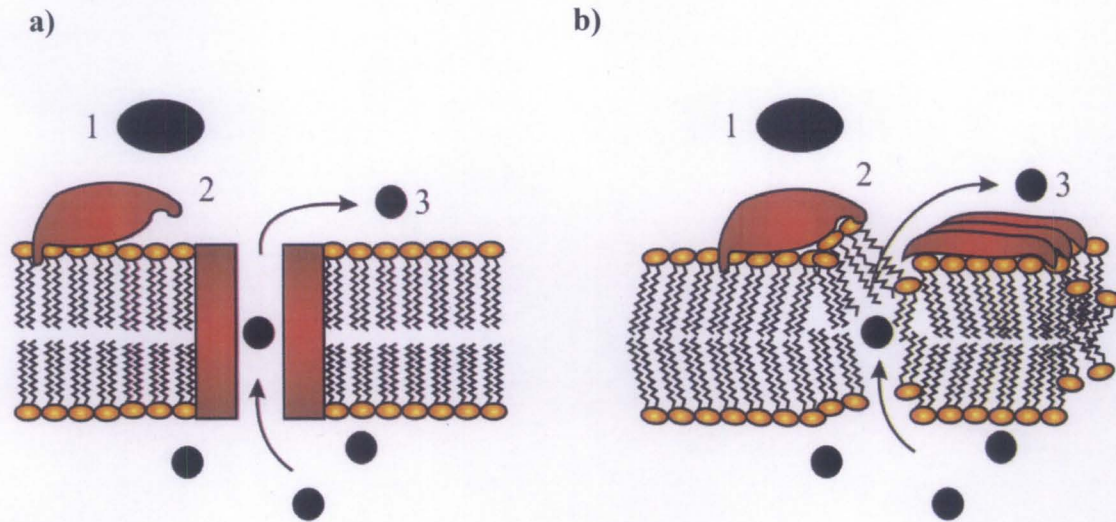
## **8.2.- Respuestas celulares inducidas por la exposición a las toxinas Cyt**

### **8.2.1.- Formación de Poros**

Se ha observado que la exposición de diferentes tipos de células eucarióticas a las toxinas Cyt provoca la muerte celular. La unión de las toxinas Cyt a la membrana plasmática está mediada por fosfolípidos no saturados tales como la fosfatidilcolina, la esfingomielina y la fosfatidiletanolamina (Thomas y Ellar., 1983). Actualmente se cuenta con mucha evidencia que sugiere que las toxinas Cyt forman poros en la membrana plasmática de la célula blanco (Figura 12a) (Knowles *et al.*, 1989; Promdonkoy y Ellar, 2000; Promdonkoy y Ellar, 2005). En particular, se ha identificado que los aminoácidos en las hélices  $\alpha A$  y  $\alpha D$  participan en la oligomerización y que las asas  $\alpha D$ - $\beta 4$  y  $\beta 6$ - $\beta 7$  podrían facilitar cambios conformacionales durante la inserción en la membrana (Promdonkoy y Ellar, 2005).

La inserción en la membrana se explica de la siguiente manera. Las dos capas externas conteniendo a las  $\alpha$ -hélices que forman parte de estructuras de tallo y asa, se apartan de la lámina  $\beta$  una vez que entran en contacto con la membrana, favoreciendo que las tres láminas  $\beta$  restantes ( $\beta 5$ ,  $\beta 6$  y  $\beta 7$ ), se inserten en la membrana (Figura 11b). Este evento permite la oligomerización con otros monómeros insertados y la formación de un barril tipo  $\beta$ , provocando la lisis celular (Promdonkoy y Ellar, 2000; Promdonkoy y Ellar, 2005).





**Figura 12.** Modelos propuestos de acción de las toxinas Cyt. En el diagrama se señala a la toxina Cyt en naranja y a las moléculas intracelulares en negro. (1) La toxina se une a los lípidos. (2) La toxina cambia de conformación y se inserta en la bicapa lipídica, donde forma poros oligoméricos (inciso a, formación de poro), o bien, se agrega en la superficie de la membrana, provocando la fragmentación de la misma en vesículas (inciso b, acción tipo detergente). (3) Las moléculas intracelulares se escapan al exterior mediante los poros formados (a), o bien, a través de regiones lipídicas desestructuradas (b) (tomado de Butko, P., 2003).

### 8.2.2.- Acción tipo detergente

Un segundo modelo que explica la toxicidad de las proteínas Cyt fue propuesto por P. Butko (2003), el cual señala que las toxinas Cyt se agregan de manera no específica en la superficie de la membrana, provocando que la membrana lipídica se desordene o se destruya por completo mediante una acción tipo detergente (Figura 12b) (Manceva *et al.*, 2005). Este modelo sugiere que la región hidrofílica de las hélices interactúa con residuos de otros monómeros para dar lugar a una agregación no específica de las moléculas Cyt en la superficie de la bicapa lipídica, lo que promueve una acción tipo detergente y un desensamblaje de la membrana.

### 8.2.3.- Sinergismo entre Cyt1A y Cry11A

Se ha observado que las toxinas Cyt1Aa y Cry11Aa interactúan de manera sinérgica. El mecanismo de acción propuesto para explicar el sinergismo reportado entre las toxinas Cyt1Aa y Cry11Aa en *Aedes aegypti* sugiere que Cyt1Aa se inserta en la membrana y funciona como receptor de la toxina Cry11Aa (Pérez *et al.*, 2005). A la toxina Cyt1Aa se le ha asignado un papel como receptor debido a que esta toxina mimetiza el sitio de unión de la FA, enzima presente en el intestino de los mosquitos que ha sido propuesta como la molécula de unión de la toxina Cry11Aa.

La Cyt1Aa, una vez insertada en la membrana, deja expuestas dos regiones, el asa  $\beta 6-\alpha E$  y parte del  $\beta 7$ , mediante las cuales se lleva a cabo la unión de la Cry11Aa. Por su parte, las asas  $\alpha 8$  y  $\beta 4$  del dominio II de la Cry11Aa están involucradas en la interacción con la Cyt1Aa, las mismas que utiliza la toxina Cry11Aa para unirse a la FA (Pérez *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2006).

### 9.- Efecto de las interacciones entre las toxinas Cyt y Cry

A pesar de que la actividad larvicida contra dípteros de las toxinas Cyt es más baja con respecto a la que presentan las toxinas Cry, el papel de la Cyt es muy importante en la eficiencia mosquitocida de *Bti*. Se piensa que las interacciones entre las toxinas Cyt y Cry han retrasado la aparición de resistencia a *Bti* en el campo (Wirth *et al.*, 2005). A la fecha, sólo en condiciones de laboratorio se han podido seleccionar poblaciones de *C. quinquefasciatus* resistentes a Cry4Aa, Cry4Ba o Cry11Aa, lo que no ha sucedido en presencia de Cyt1Aa (Wirth *et al.*, 1997).

Un fenómeno muy interesante que se presenta es que la toxicidad producida por la combinación de toxinas sintetizadas por *Bti* es mayor que la simple adición de la actividad esperada al considerar las toxicidades de las proteínas individuales, fenómeno al que se ha denominado sinergismo. Este fenómeno se ha demostrado en los mosquitos *Ae. aegypti* y

*C. quinquefasciatus* (Hernández-Soto *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2005; Promdonkoy y Ellar., 2005; Tabashnik, B.E., 1992; Wu y Chang 1985).

### **9.1.- Sinergismo entre toxinas Cry**

Además del sinergismo observado entre las toxinas Cry y Cyt de *Bti*, también se ha reportado la existencia de sinergismo entre las diferentes toxinas Cry que forman parte del cristal de *Bti*, en contra de *Ae. aegypti*, *Anopheles stephensi*, *An. gambiae*, *Culex pipiens* y *C. quinquefasciatus* (Wu y Chang, 1985; Angsuthanasombat *et al.*, 1992; Delecluse *et al.*, 1993; Poncet *et al.*, 1995; Ben Dov *et al.*, 1995; Crickmore *et al.*, 1995). El mecanismo molecular del sinergismo entre toxinas Cry se desconoce.

### **10.- *Anopheles albimanus*, principal vector de Malaria en México**

El mosquito *An. albimanus* se distribuye en el continente americano desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Perú (Bejarano, E. E., 2003). Este mosquito constituye el principal vector de transmisión de Malaria en México (Rodríguez *et al.*, 2000). De acuerdo a información divulgada por la Dirección General de Epidemiología, se reportó que la incidencia de paludismo fué de 2.77 a 7.27 casos por cada 100 000 habitantes en los años comprendidos entre el 2000 y el 2005 y se estima que 30% de la población se encuentra en riesgo. El total de casos de malaria causados por *P. vivax* acumulados hasta la semana 14 durante el 2010 es de 238, siendo Chiapas el estado que ha registrado el 62% de los mismos (<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2010/sem14/pdf/cua7.pdf>).

El método de control de los anofelinos presentes en nuestro país (*An. albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis* y *Anopheles vestitipennis*), se ha basado por más de medio siglo en la aplicación de DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis[*p*-clorofenil] etano) y más recientemente, de piretroides. El uso indiscriminado de insecticidas químicos ha favorecido el desarrollo de resistencia en *An. albimanus* (Dzul *et al.*, 2007), lo cual representa un grave problema que mina los esfuerzos encaminados en contra de la malaria, haciendo urgente el empleo de un método alternativo como el que ofrece *Bti*.

Aún cuando se ha reportado que *An. albimanus* es susceptible al cristal de *Bti* (Ibarra *et al.*, 2003), no se ha descrito la susceptibilidad de este vector a los componentes individuales del cristal de *Bti* ni a las posibles interacciones entre dichos componentes. Por último, se desconocen cuales pudieran ser las moléculas receptoras para estas toxinas presentes en el intestino de *An. albimanus*.

## **HIPÓTESIS**

Algunos de los receptores de las toxinas Cry caracterizados en insectos lepidópteros como son la Caderina, la Aminopeptidasa-N y la Fosfatasa Alcalina, son receptores de las toxinas Cry en *An. albimanus*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Entender el mecanismo de toxicidad del cristal de *Bti* en contra de *An. albimanus*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- a) Evaluar la actividad tóxica de cada uno de los componentes del cristal de *Bti*.
- b) Evaluar las interacciones entre los diferentes componentes del cristal de *Bti* que generan la toxicidad en contra de *An. albimanus*.
- c) Identificar el receptor de las toxinas con mayor actividad contra *An. albimanus*.

## RESULTADOS

CONTRIBUCIÓN ORIGINAL <sup>1</sup>

An  $\alpha$ -amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae).

Fernández-Luna MT, Lanz-Mendoza H, Gill SS, Bravo A, Soberón M,  
Miranda-Ríos J.

*Environ Microbiol.* 12 (3): 746 – 757, 2010.

## RESÚMEN

*Bacillus thuringiensis ssp. israelensis (Bti)* produce cuatro toxinas Cry (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa y Cry11Aa) y dos proteínas Cyt (Cyt1Aa y Cyt2Ba), tóxicas contra larvas de mosquitos de los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*, vectores importantes de enfermedades humanas que transmiten los parásitos del dengue, malaria y filariasis, respectivamente. Trabajos previos han demostrado que *Bti* es muy tóxico contra *Anopheles albimanus*, el principal vector que transmite la malaria desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Perú. En este trabajo analizamos la toxicidad individual de las proteínas Cry y Cyt que componen al cristal de *Bti* e identificamos una proteína del intestino de *An. albimanus* como un posible receptor de las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa. Mediante bioensayos se demostró que Cry4Ba y Cry11Aa son los componentes de *Bti* más tóxicos contra larvas de *An. albimanus*. Mediante ensayos de unión a ligando demostramos que una proteína de 70 kDa anclada mediante glicosilfosfatidilinositol localizada en el borde apical de la microvellosidad del intestino de larvas de *An. albimanus* interactúa con las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa. Esta proteína fue identificada mediante espectrometría de masas, cromatografía de afinidad y ensayos de actividad enzimática como una  $\alpha$ -amilasa. El cDNA que codifica para la  $\alpha$ -amilasa se clonó mediante experimentos 5' y 3' RACE (rapid amplification of cDNA ends). Se encontró que la  $\alpha$ -amilasa recombinante expresada en *Escherichia coli* se une de manera específica a las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa.



# An $\alpha$ -amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae)

Maria Teresa Fernandez-Luna,<sup>1</sup>  
Humberto Lanz-Mendoza,<sup>2</sup> Sarjeet S. Gill,<sup>3</sup>  
Alejandra Bravo,<sup>1</sup> Mario Soberon<sup>1</sup> and  
Juan Miranda-Rios<sup>1\*†</sup>

<sup>1</sup>Depto. de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, México.

<sup>2</sup>Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos 62508, México.

<sup>3</sup>Department of Cell Biology and Neuroscience, University of California, Riverside, CA 92521, USA.

## Summary

*Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* (*Bti*) produces four Cry toxins (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa and Cry11Aa), and two Cyt proteins (Cyt1Aa and Cyt2Ba), toxic to mosquito-larvae of the genus *Aedes*, *Anopheles* and *Culex*, important human disease vectors that transmit dengue virus, malaria and filarial parasites respectively. Previous work showed that *Bti* is highly toxic to *Anopheles albimanus*, the main vector for transmission of malaria in Mexico. In this work, we analysed the toxicity of isolated Cry proteins of *Bti* and identified an *An. albimanus* midgut protein as a putative Cry4Ba and Cry11Aa receptor molecule. Bioassays showed that Cry4Ba and Cry11Aa of *Bti* are toxic to *An. albimanus* larvae. Ligand blot assays indicated that a 70 kDa glycosylphosphatidylinositol-anchored protein present in midgut brush border membrane vesicles of *An. albimanus* interacts with Cry4Ba and Cry11Aa toxins. This protein was identified as an  $\alpha$ -amylase by mass spectrometry and enzymatic activity assays. The cDNA that codes for the  $\alpha$ -amylase was cloned by means of 5'- and 3'-RACE

experiments. Recombinant  $\alpha$ -amylase expressed in *Escherichia coli* specifically binds Cry4Ba and Cry11Aa toxins.

## Introduction

Due to their ability to spread diseases like malaria, yellow fever, dengue and lymphatic filariasis among others, mosquitoes are deadly disease vectors, causing millions of deaths, and represent one of the biggest public-health threats. It is estimated that mosquitoes transmit disease to 700 000 000 people each year (WHO, 1996). For instance, malaria causes up to three million deaths and five billion clinical cases each year, with 90% of them occurring in Africa (Breman *et al.*, 2004).

One way to stop the spread of mosquito-borne diseases is to control vector populations. A common control strategy has been the use of chemical compounds that not only harm the environment but lead to the appearance of resistant mosquitoes. One environmentally friendly alternative method to control these insects is the use of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (Bravo *et al.*, 2007).

Toxin crystals from the mosquitocidal strain *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* (*Bti*) are composed of four major insecticidal Cry proteins (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa and Cry11Aa) and two Cyt proteins (Cyt1Aa and Cyt2Ba), whose genes are found on a large plasmid (Berry *et al.*, 2002). Although each toxin, by itself, displays low toxicity, their combined toxic effect is synergistic towards mosquito larvae, as shown by the interaction between Cry11Aa and Cyt1Aa proteins (Crickmore *et al.*, 1995; Perez *et al.*, 2005).

An emerging model has been drawn to explain the toxicity of Cry proteins to lepidopteran insects (Bravo *et al.*, 2004; Bravo *et al.*, 2007). After crystal solubilization the protoxins released are activated by proteases found in the larval midgut, followed by the binding of toxins to the primary receptor cadherin (Vadlamudi *et al.*, 1995). Binding to cadherin induces the cleavage of helix  $\alpha$ -1 located at the N-terminal end of the toxin, facilitating its oligomerization (Gomez *et al.*, 2002). Then, the toxin oligomer binds to a secondary receptor such as the enzymes aminopeptidase N (APN) (Knight *et al.*, 1994;

Received 3 July, 2009; accepted 19 October, 2009. \*For correspondence. E-mail riosjuanm@biomedicas.unam.mx; Tel. (+52) 5556226423; Fax (+52) 5556063489. †Present address: Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and Instituto Nacional de Pediatría, México DF, 04510, México.

**Table 1.** *Anopheles albimanus* fourth instar larvae sensitivity to different *Bti* Cry mosquitocidal toxins.

Toxin	LC <sub>50</sub> (ng ml <sup>-1</sup> )
Cry4Ba, Cry 11Aa, Cry 4Aa, Cyt1Aa, Cyt2Ba	2 (1–3) <sup>a</sup>
Cry4Ba	130 (80–200)
Cry11Aa	900 (720–1120)
Cry4Aa	> 2 000
Cyt1Aa	> 10 000

a. 95% fiducial limits.

Bravo *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2006), and alkaline phosphatase (ALP) (Jurat-Fuentes and Adang, 2004), which are membrane anchored by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) group. Finally, the oligomeric toxin forms a pore in the membrane that leads to cell death (Rausell *et al.*, 2004; Pardo-Lopez *et al.*, 2006).

It has been reported that Cry toxins active against dipteran larvae bind similar proteins to the receptors identified in lepidopteran insects. The dipteran specific Cry11Ba toxin binds to an APN from *Anopheles quadrimaculatus* (Abdullah *et al.*, 2006), Cry11Aa and Cry4Ba interact with an ALP from *Aedes aegypti* (Fernandez *et al.*, 2006; Bayyareddy *et al.*, 2009; Fernandez *et al.*, 2009), and Cry4Ba and Cry11Aa are recognized by a cadherin-like protein from *Anopheles gambiae* and *Ae. aegypti* respectively (Hua *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009).

In this work, we describe the identification and cloning of an  $\alpha$ -amylase from the midgut of *An. albimanus*, the principal vector of malaria in Mexico. This  $\alpha$ -amylase specifically binds Cry4Ba and Cry11Aa toxins. Ligand blot, 2D PAGE, MS identification, affinity chromatography and enzymatic activity assays were used to characterize this  $\alpha$ -amylase as a putative *Bt* toxin receptor in mosquito larvae.

## Results and discussion

### *Anopheles albimanus* larvae sensitivity to *Bti* mosquitocidal toxins

As a first step to identify protein molecules that bind Cry toxins present in the midgut of *An. albimanus* fourth instar larvae, we performed bioassays to determine the toxicity of the parasporal crystals composed of individual Cry4Ba, Cry4Aa, Cry11Aa and Cyt1Aa toxins from *Bti*. As shown in Table 1, the parasporal crystals of *Bti* exhibited a high toxicity. In the case of the individual toxins, the most toxic protein was Cry4Ba, followed by Cry11Aa. Cry4Aa and Cyt1Aa showed no toxicity at the highest concentration of toxin tested.

Although it has been previously reported that *An. albimanus* is sensitive to the parasporal crystal of *Bti* (Ibarra

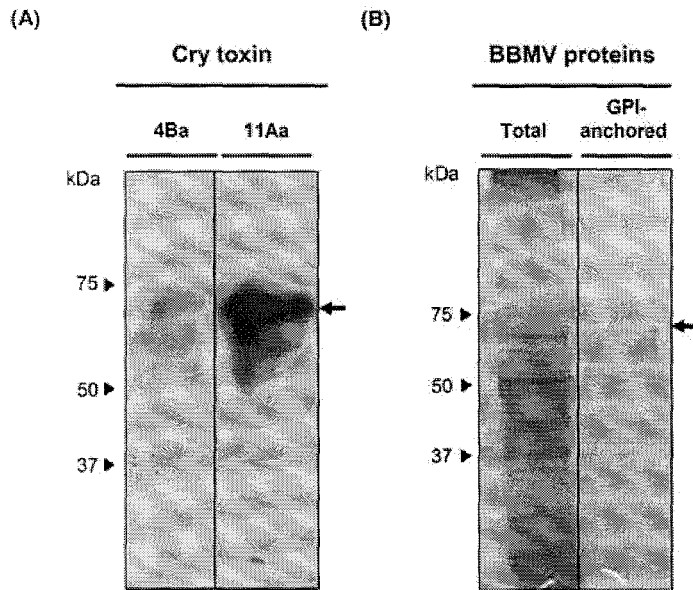
*et al.*, 2003), this is the first time that the toxicity displayed by individual components of the *Bti* crystal has been assessed. We found that individual toxins of *Bti* are less toxic than their combination, probably due to the synergism observed between the different Cry and Cyt proteins, as observed originally for Cry11Aa and Cyt1Aa proteins in *Ae. aegypti* (Crickmore *et al.*, 1995; Perez *et al.*, 2005).

The toxicity values of different Cry toxins reported here for *An. albimanus* are similar to those found for *An. stephensi*: Cry4Ba and Cry11Aa proteins were highly toxic to this insect (Delecluse *et al.*, 1993; Poncet *et al.*, 1995; Revina *et al.*, 2004), while Cry4Aa and Cyt1Aa showed low toxicity towards this mosquito larvae (Delecluse *et al.*, 1993; Poncet *et al.*, 1995; Thiery *et al.*, 1997).

### *Cry4Ba* and *Cry11Aa* toxins bind to a 70 kDa protein in *An. albimanus* brush border membrane vesicle proteins

It has been reported that some receptors for Cry toxins are GPI-anchored membrane proteins in *An. quadrimaculatus* and *Ae. aegypti* larvae (Abdullah *et al.*, 2006; Fernandez *et al.*, 2006). We performed ligand blot binding assays of brush border membrane vesicle (BBMV) proteins released after treatment with phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC), which specifically cleaves proteins that are anchored to the membrane by a GPI anchor. As depicted in Fig. 1A, Cry4Ba and Cry11Aa toxins bound a GPI-anchored protein of approximately 70 kDa. Although two other minor bands are visible on the ligand blot for both toxins, they probably represent degradation products.

In this work we found an inverse relationship between binding of Cry4Ba and Cry11Aa toxins to their putative receptor and the toxicity displayed towards *An. albimanus* larvae. We observed that Cry4Ba is almost seven times more toxic than Cry11Aa, while binding to the 70 kDa protein is higher for Cry11Aa than for Cry4Ba. This is similar to what have been reported for Cry1Ab toxin that shows a higher toxicity towards *Lymantria dispar* (gypsy moth) than Cry1Ac, even though Cry1Ac shows a higher affinity towards its receptor (Wolfersberger, 1990). Pore formation in insect midgut cells involves the binding to the membrane and insertion into the membrane of Bt toxins, which have been recognized as reversible and irreversible steps of the mechanism of action of the toxins respectively (Liang *et al.*, 1995). In this context, toxicity was found to be directly correlated to the rate constant of irreversible binding (Liang *et al.*, 1995). As we have not measured the rate constant of irreversible binding for Cry4Ba and Cry11Aa toxins to the 70 kDa protein, the discrepancy between binding and toxicity shown may be only apparent.



**Fig. 1.** A 70 kDa GPI-anchored protein that interacts with Cry4Ba and Cry11Aa toxins is an  $\alpha$ -amylase.

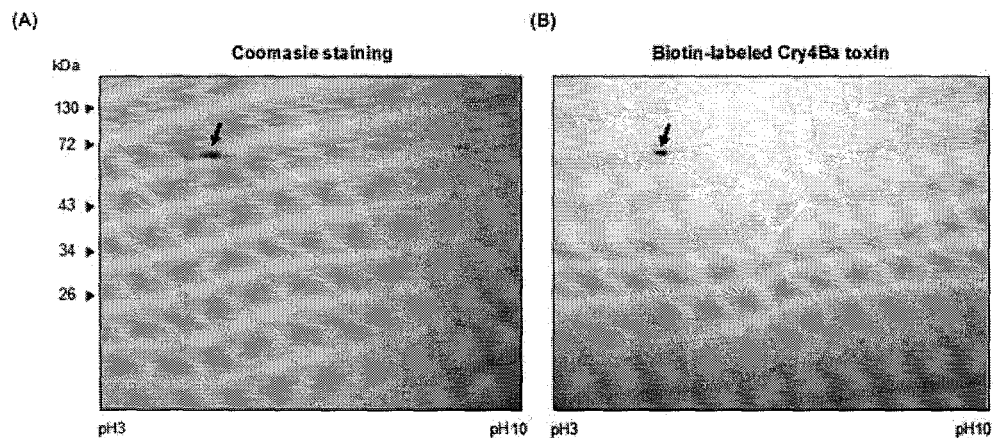
A. Cry4Ba and Cry11Aa toxins bind a GPI-anchored protein. BBMVs isolated from *An. albimanus* midgut larvae were treated with phospholipase C to release the GPI-anchored protein fraction, which was subjected to SDS-PAGE and electroblotted. Proteins that bound biotin-labelled Cry4Ba and Cry11Aa toxins were detected by a ligand blot assay. B. The main component of the BBMV GPI-anchored protein fraction is a 70 kDa  $\alpha$ -amylase. BBMV total proteins and BBMV proteins anchored by GPI were run in a SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Arrow shows the protein band that was sequenced by LC-MS/MS.

*Identification of the 70 kDa protein band by mass spectrometry*

When the PI-PLC-treated fraction of BBMV was subjected to an SDS-PAGE, we observed a very prominent band of 70 kDa, the same size of the protein bound by Cry4Ba and Cry11Aa toxins (Fig. 1B). By *de novo* sequencing of the 70 kDa protein, the amino acid sequence (DIT FEETQDPQAANTNPDVYQQFTR) was obtained. This sequence was analysed by BLAST (Altschul *et al.*, 1997), showing high identity to  $\alpha$ -amylase enzymes from other mosquitoes like *Ae. aegypti*, *Culex quinquefasciatus*

and *An. gambiae* (GenBank accession numbers XP\_001660907, XP\_001863693 and XP\_001689203).

As a way to confirm that the 70 kDa protein is the protein that is recognized by Cry4Ba toxin, we performed a 2D SDS-PAGE of the protein sample obtained after treatment with PI-PLC, followed by a ligand blot assay using biotin-labelled Cry4Ba toxin. The Cry4Ba toxin bound a 70 kDa protein that shows an acidic pI (Fig. 2B). The corresponding spot on a colloidal Coomassie blue stained 2D gel was picked up and sequenced by LC-MS/MS (Fig. 2A). As a result, sequences of three additional peptides of 12, 19 and 16 amino acids were



**Fig. 2.** Cry4Ba toxin binds an acidic, 70 kDa GPI-anchored protein. Colloidal Coomassie blue stained 2D gel (A) and ligand blot using biotin-labelled Cry4Ba toxin (B). Arrow shows the spot that was subjected to LC-MS/MS sequencing.

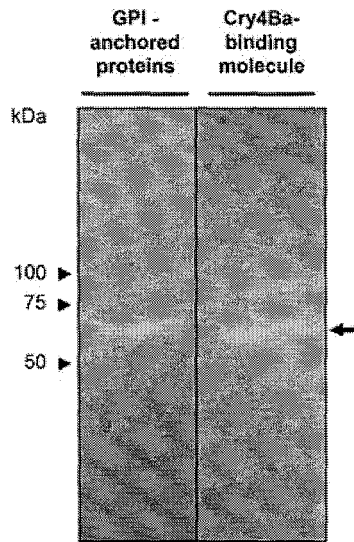


Fig. 3. A Cry4Ba binding protein shows  $\alpha$ -glucosidase activity. In-gel  $\alpha$ -glucosidase assay of the BBMV GPI-anchored protein fraction and the protein bound by an Agarose-Cry4Ba column.

obtained. The peptide sequences identified were VILD FVPNHTSDEHEWFVK, ANLEQTMLWYGN and YTQN LPECYDLIYDWR, which upon BLAST showed high identity to  $\alpha$ -amylases, as the first identified peptide.

#### Analysis of $\alpha$ -glucosidase activity of the $\alpha$ -amylase protein purified by Cry4Ba affinity chromatography

Our peptide sequences showed that the 70 kDa protein bound by Cry4Ba shows similarity to the  $\alpha$ -amylase family of glycosyl hydrolases. As  $\alpha$ -glucosidase enzymes belong to the  $\alpha$ -amylase family, an in-gel  $\alpha$ -glucosidase assay was performed with a protein sample obtained after treatment of BBMV proteins with PI-PLC-enzyme. We observed  $\alpha$ -glucosidase activity in a 70 kDa band as shown in Fig. 3. In order to assess if the protein that shows  $\alpha$ -glucosidase activity is able to bind Cry4Ba toxin, we performed an affinity chromatography purification using an agarose-Cry4Ba column. The 70 kDa protein that is retained in the column displayed  $\alpha$ -glucosidase activity (Fig. 3), supporting the idea that an  $\alpha$ -amylase protein is a binding molecule of the Cry4Ba toxin.

#### cDNA cloning of Aamy1, an $\alpha$ -amylase from *An. albimanus* larvae midgut that binds to Cry4Ba toxin

To clone the cDNA encoding the  $\alpha$ -amylase we performed 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) experiments. Primer oligonucleotides were designed based on the sequence of one of the peptides identified by LC-MS/MS as described in *Experimental procedures*. Total

mRNA was purified from midguts of fourth instar larvae of *An. albimanus*. Two fragments of 1305 bp and 750 bp were cloned as described in *Experimental procedures* that represent the 5' RACE and 3' RACE amplicons respectively. Both fragments were sequenced in both strands. The resulting DNA sequence, consisting of 1997 bp in length, codes for a protein of 605 amino acids (Fig. 4). Additionally, 53 bp and 111 bp of DNA sequence of the 5' and 3' untranslated regions were obtained respectively.

#### Characterization of Aamy1 protein

The Aamy1 protein composed of 605 amino acids has a predicted molecular weight of 69 kDa and a pI of 4.94. In addition, all of the four identified peptides by MS are present in this amino acid sequence (Fig. 4). The protein shows a cleavage site for a putative N-terminal leader peptide between G21 and K22, as well as an  $\omega$ -site for GPI lipid anchoring (S584) (Fig. 4). It also shows sites for potential N-glycosylation (N134 and N288) (Fig. 4). Furthermore, Aamy1 protein displayed conserved domains characteristic of  $\alpha$ -amylases (Marchler-Bauer *et al.*, 2009), including seven conserved blocks distinctive of the  $\alpha$ -amylase family of enzymes (see Fig. 4) (Janeček, S., 1997). Several residues that are highly conserved in this enzyme family are found on Aamy1 amino acid sequence: residues D230, E296 and D364, which are present in the active site of the enzyme; histidines H135, H234 and H363, which are thought to be involved in substrate binding and, finally, residues N134, D200 and H234 that potentially bind calcium ions (Fig. 4) (Janeček, S. (1997).

All these characteristics are consistent with the proposed identification of the 70 kDa protein as an  $\alpha$ -amylase that binds to Cry4Ba and Cry11Aa toxins.

#### Heterologous expression of the cDNA that codes for the $\alpha$ -amylase that binds to Cry4Ba and Cry11Aa toxins from *Bti*

To determine if the cloned  $\alpha$ -amylase corresponds to the Cry4Ba binding protein identified in BBMV from *An. albimanus*, we assembled by PCR the  $\alpha$ -amylase coding region devoid of the signal peptide and sequences downstream of the GPI-anchoring site, and cloned it into pGEX-4T-3 expression vector to obtain construct pAamy1. Recombinant protein was expressed in *Escherichia coli* as a fusion protein with glutathione transferase as described in *Experimental procedures*. We observed the expression of a protein of apparent molecular weight of 90 kDa, consistent with the expected size of the recombinant fusion protein. Ligand blot experiments showed that the 90 kDa protein bound biotin-labelled Cry4Ba and Cry11Aa toxins, but did not bind biotin-labelled Cry3Aa toxin, known to be non-toxic to *An. albimanus* (Fig. 5A). Besides the 90 kDa band, two other proteins of 34 and

```

1 GGTATCGGAGATCGAGAGAGAGTGTGTGTACGAACGGTCTTCTCTAGCGCACGATGCGGTT
    m r l
61 TGACGGTGGAGCTTGTGGTGGCGATCGGCCTTGGCATCATTGCGGTGGCCAGTGGAAAAGA
4 t v s l l v a i g l g i i a v a s g K T
121 CGGCACCGGGCCGGCAGTTCGCACGATCACGGATCCCTCGACTGGTGGGAGGCGGGAGTGT
24 A P G R Q S H D H G S L D W W E A G V F
181 TCTATCAAATCTATCCGCGCTCGTTCAAGGACAGTGACAACAATGGTGTGGCGACCTGA
44 Y Q I Y P R S F K D S D N N G V G D L K
241 AGGGTATTACGGAGAAGCTGAACCATTTGGTTCGATCTCGGTATCGATGATGTTGGCTCA
64 G I T E K L N H L V D L G I D D V W L S
    I
301 GCCCGTCTTTACGTTCGCGGATGGCCGATTTTCGGTACGACATCGCCGATTCGCGCTCGA
84 P V F T S P M A D F G Y D I A D F R S I
361 TCGATCCACTGTTTCGGTACGATGGCCGACCTGGACGCTATGATCGCGAAGGCAAAAGATC
104 D P L F G T M A D L D A M I A K A K D L
421 TGGGCATCCGGGTGATACTGGACTTTGTGCGCAATCATAACGAGCGATGAGCACGAGTGGT
124 G I R V I L D F V P (N) (H) T S D E H E W F
    II
481 TCGTGAAGGCAAGAACAACGATCCCGCTTCCGTGACTTTTACGTGTGGCGCGATCCGA
144 V K A K N N D P A F R D F Y V W R D P R
541 GGGGAAACCGCGAGCCGAACAACCTGGCAATCGGTCTTCCGCACGCCCGCTGGACGAGGC
164 G N A E P N N W Q S V F R T P A W T R L
601 TGCCAGGCGCAGCCAGTACTACCTTACCAGTTTCGACAAGAAGCAACCGGATCTGAACT
184 P G D S Q Y Y L H Q F D K K Q P D L N Y
    III
661 ACCGGAATCAGCGGTGAAGGACGAGATGGAGTTCGATGATTCGGTTCTGGCTGGACAAGG
204 R N Q R V K D E M E S M I R F W L D K G
721 GCGTCGATGGGTTCCGCATCGATGCGATCAACCATGTGTACGAGGATCCGCGAGTCCCGG
224 V D G F R I (D) A I N (H) V Y E D P Q F R D
    IV
781 ATGAGGAGCTGATCGATCCGAAAGGGGAGCTGATCTGGGAGAACCCTGGACCACAAGTACA
244 E E L I D P K G E L I W E N L D H K Y T
841 CGCAGAATCTGCCGAGTGTCTACGATCTGATCTACGATTTGGCGGACGTGTTTGATCAGT
264 Q N L P E C Y D L I Y D W R D V F D Q Y
901 ACAAGCGCGGGACAATGTGACCGCCTGATGATGACGGAGGCGTACGCTAACCTGGAGC
284 K A R D (N) V T R L M M T (D) A Y A N L E Q
    V
961 AGACGATGCTGTGGTACGGTAACCCGACGCGCAACCGCAAGGGTGCCACATACCGTTCA
304 T M L W Y G N P Q R N R K G A H I P F N
1021 ACTTCGCCATGATCAACCGCCTGTGCAACGATTCGCGGGCCGGTACTTCAAGGCGATCG
324 F A M I N R L S N D S R A G D F K A I V
1081 TCGACGAGTGGTGGATGCGATGCCGGCCGGTCAGCAGGCGAACTGGGTGCTCGGTAATC
344 D E W L D A M P A G Q Q A N W V L G N (H)
    VI

```

**Fig. 4.** Nucleotide sequence of *amy1* gene and its deduced amino acid sequence. The initiation and stop codons are indicated by a star (↗) and an asterisk (\*) respectively. Peptide sequences obtained from LC-MS/MS identification are underlined. The N-terminal hydrophobic domain that corresponds to the putative signal peptide is shown in lower case. The ω-site for GPI modification and the amino acid putatively implicated in the cleavage site is shown as a pentagon. Asparagines predicted to be N-glycosylated are encircled. Seven conserved regions (I to VII) characteristic of the α-amylase family proteins are boxed. The catalytically important residues, the histidines responsible for substrate binding and the amino acids involved in binding of calcium ions are referred by diamonds, squares or a double underline respectively. The GenBank accession number of *amy1* gene is GQ344953.

20 kDa were observed (Fig. 5A). A control experiment in which a sample of the cellular extract from *E. coli* containing an empty vector showed the same 34 and 20 kDa bands, indicating that these bands are not recognized by biotin-labelled Cry4Ba nor Cry11Aa, but represent a detection artifact (Fig. 5A).

In order to assess the specificity of binding of Cry4Ba toxin to the recombinant 90 kDa protein, a homologous competition experiment was performed. Binding was

shown to be specific since a 50-fold excess of unlabelled Cry4Ba protein abolished the binding of biotin-labelled Cry4Ba toxin to the 90 kDa protein (Fig. 5B).

#### *Amy1* constitutes a novel class of receptor for Cry toxins

The protein bound by Cry4Ba and Cry11Aa toxins has homology to the α-amylase protein family, also known as

```

1141 ACGATCGTCCCGGTATCGCTTCCCGCTTCGGTCCGATCGGGCATCCAGCTTTGCCGTGC
364 DR P R I A S R F G R D R A S S F A V L
1201 TCGAGATGACCGTTCGCCGGTATTGCGGTGGTGTACTACGGCGAGGAGATCGGCATGGAGG
384 E M T L P G I A V V Y Y G E E I G M E D
V I I
1261 ACAACCGGGACATTACGTTTCGAGGAGACGCAGGACCCGCGAGGCGGCTAACACGAACCCGG
404 N R D I T F E E T Q D P Q A A N T N P D
1321 ACGTGTACCAGCAGTTCACGCGGATCCCGTCCGACCCCGTTCAGTGGGATGACACGG
424 V Y Q Q F T R D P V R T P F Q W D D T A
1381 CGTACGCCGGCTTTACGGGCGCAGCGGCACGGGAGACCTGGCTCCCGGTGCATCCCAACT
444 Y A G F T G A A A R E T W L P V H P N Y
1441 ATCGGCAGATTAATCTCGCGGCCAGAAAGGCCCGCCCGCAGAGCATGTTCAAGCTGTACC
464 R Q I N L A A Q K A A P Q S M F K L Y Q
1501 AGCGTTTGATTACAGTGCAGCAAGGGCGACACCTTCCGGTATGGTACTACGAGTCAAGG
484 R L I Q L R K G D T F R Y G D Y E S K V
1561 TGATGCTGAACAATGTGTTCCGGCTATACGCGCACCCCTCGAAGGTCACGAATCGTACGCCG
504 M L N N V F G Y T R T L E G H E S Y A V
1621 TGGTGGTCAATCTGAACGACAACGATGTGAACGTGAACCTGCAGGAGCTGCACCCCGATG
524 V V N L N D N D V N V N L Q E L H P D V
1681 TGGGGGCAGCGAAGGTTGTGCTCACGTCGCTCGATGCCAAGCTGAAGGAGGGTGACGAGA
544 G A A K V V L T S L D A K L K E G D E I
1741 TAACGGAAGTGTTCACGTCATCGTCCGGTCCGTACGATGCGGTTGTGTTGAGATTTCCCT
564 T E V F H V I V G A Y D A V V F E I S S
1801 CGTCCGCCAGTACGCTCGGCGTTCGATGGTACTGATGCTGTTTCGCTTCCATCCTGCGCT
584 S A S T L G V S M V L M L F A S I L R S
1861 CCCGTGTTCTAGGTGAGGCGTFCGCTTTAACTTATTTTCTCCCTCAAACGTCGCTTTTAC
604 L F *
1921 TGAACGCACTTTCCATTAACCTAGACTGTAAATTGTATGCCGGGCCTTCTGTGCATGGTG
1981 ATAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Fig. 4. cont.

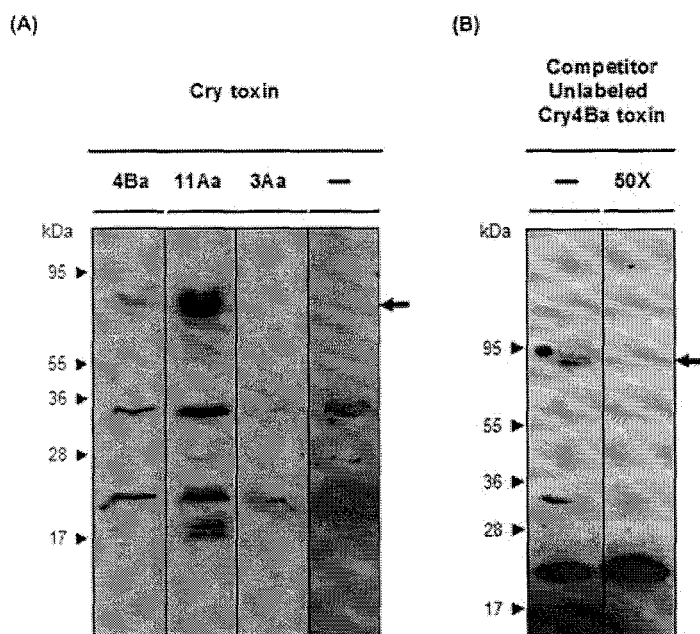
family 13 of glycoside hydrolases that groups together a large number of enzymes that act on  $\alpha(1-4)$  glycosidic linkages present on starch, glycogen and related polysaccharides (Janeček, S., 1997; Stam *et al.*, 2006).

Other members of the  $\alpha$ -amylase family protein have been reported as receptors for bacterial toxins. This is the case for the  $\alpha$ -amylases of *C. pipiens* and *An. gambiae* that were identified as the binding molecules for the binary toxin of *Bacillus sphaericus* (Silva-Filha *et al.*, 1999; Romao *et al.*, 2006; Opota *et al.*, 2008). Although the Aamy1 protein is also an  $\alpha$ -amylase, it shows only moderate sequence identity to the  $\alpha$ -amylases found as receptors for the binary toxin.

It has been proposed that Cry toxins active against lepidopteran insects interact with a primary receptor (cadherin). Such interaction promotes the proteolytic cleavage of the N-terminal helix  $\alpha$ -1, inducing toxin oligomerization. A second interaction between toxin oligomers and GPI-anchored proteins as APN or ALP promotes the insertion of the oligomers into lipid rafts membrane, forming pores

that cause cell lysis. Although less is known in the case of dipteran larvae, it has been suggested that mosquitocidal specific Cry toxins may follow a similar mode of action (Soberon *et al.*, 2007). In *An. gambiae*, cadherin is a functional receptor for Cry4Ba and GPI-anchored proteins, such as APN and ALP, have been shown to bind Cry4Ba and Cry11Aa in *An. quadrimaculatus* and *Ae. aegypti* respectively (Abdullah *et al.*, 2006; Fernandez *et al.*, 2006; 2009; Hua *et al.*, 2008; Bayyareddy *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2009). Furthermore, Cry11Aa toxin oligomerizes in the presence of *Ae. aegypti* BBMV proteins, leading to pore formation (Perez *et al.*, 2007). In the same way, it has been shown that Cry4Ba toxin is able to form oligomers and insert into lipidic vesicles (Likitvivanavong *et al.*, 2006).

The  $\alpha$ -amylase identified in this work constitutes a new class of receptor molecules for the Cry toxins. Further research on the interaction between monomeric or oligomeric structures of Cry4Ba or Cry11Aa toxins and the  $\alpha$ -amylase is needed to determine the role that this recep-



**Fig. 5.** Specific binding of Cry4Ba toxin to heterologous expressed Aamy1 protein.

A. Ligand blot analysis of cell extracts of *E. coli* expressing Aamy1 protein using biotin-labelled Cry4Ba, Cry11Aa or Cry3Aa toxins. As a negative control, cell extracts prepared from *E. coli* cells transformed with an empty plasmid, in the absence of any biotin-labelled Cry toxin but incubated with Streptavidin-peroxidase (lane marked with a dash).

B. Homologous competition of Cry4Ba binding to heterologous expressed Aamy1 protein. Ligand blot analysis of cell extracts of *E. coli* expressing Aamy1 protein using biotin-labelled Cry4Ba toxin in the absence or the presence of an excess (50x) of unlabeled Cry4Ba protein.

tor is playing in the mechanism of action of these toxins. In addition, more studies should be carried on to know if there are other protein receptors involved in the toxicity of Cry4Ba and Cry11Aa toxins towards *An. albimanus*.

## Experimental procedures

### Bacterial strains and plasmids

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 2. *Bt* strains were grown in nutrient broth sporulation medium at 200 r.p.m and 30°C (Lereclus *et al.*, 1995). The medium was supplemented with erythromycin, as follows: for

strains containing Cry4Ba and Cry4Aa, 5 µg ml<sup>-1</sup>; Cry11Aa, 25 µg ml<sup>-1</sup>; Cry11Ba, 50 µg ml<sup>-1</sup> and Cyt1Aa, 10 µg ml<sup>-1</sup>. For *E. coli* strains LB medium was used for growth supplemented with ampicillin at the concentration of 100 µg ml<sup>-1</sup>.

### Insects

Mosquitoes were reared at 28°C, 75% humidity and 12/12 light/dark photoperiod. Guts from fourth instar larvae were dissected under a stereomicroscope and stored at -80°C in MET (300 mM mannitol, 5 mM EGTA and 200 mM Tris, pH 7.4), supplemented with 1 mM PMSF and 1 mM DTT, until used.

**Table 2.** The bacterial strains and plasmids used in this study.

	Characteristics	Reference
<i>Bt</i> strains		
<i>Bti</i> HD916	Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, Cry10Aa, Cyt1Aa, Cyt2Ba	Bacillus Genetic Stock Center (Columbus OH)
<i>Bt</i> CG6	<i>B. thuringiensis</i> crystal negative strain	Chang <i>et al.</i> (1993)
4Q7	<i>Bti</i> crystal negative strain	D. Dean, The Ohio State University, USA
BTS1	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i> strain containing Cry3Aa gene	M. Peferoen, Plant Genetic Systems, Belgium
Plasmids		
pWF26	Cry11Aa, Ery <sup>R</sup>	Wu and Federeci (1995)
pHT606	Cry 4Aa, Ery <sup>R</sup>	Delecluse <i>et al.</i> (1993)
pHT611	Cry4Ba, Ery <sup>R</sup>	Delecluse <i>et al.</i> (1993)
pWF45	Cyt1Aa, Ery <sup>R</sup>	Wu <i>et al.</i> (1994)
p1.3-2	1.3 kb fragment of <i>An. albimanus</i> α-amylase cloned into plasmid pCR2.1-TOPO, Amp <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	This work
pISO-1	0.75 kb fragment of <i>An. albimanus</i> α-amylase cloned into plasmid pCR2.1-TOPO, Amp <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	This work
pAamy1	<i>An. albimanus</i> α-amylase gene coding for Aamy1 protein cloned into expression vector pGEX-4T-3, Amp <sup>R</sup>	This work

Ery<sup>R</sup>, erythromycin resistant; Amp<sup>R</sup>, ampicillin resistant; Km<sup>R</sup>, kanamycin resistant.



#### Purification and labelling of Cry and Cyt proteins

Spores and crystals produced in *Bt* strains harbouring plasmids that express only Cry4Ba, Cry4Aa, Cry11Aa or Cyt1Aa toxins, wild-type *Bti* or *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* strain producing Cry3Aa toxin were harvested and washed three times with 0.3 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 8.0. The pellet was suspended in 0.1% Triton X-100, 300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.2, and inclusions were purified by sucrose gradient centrifugation (Thomas and Ellar, 1983). Purified Cry4Ba inclusions were solubilized in carbonate buffer (sodium bicarbonate/carbonate 0.1 M, pH 9.5) supplemented with 0.2% β-mercaptoethanol (pH 10.5), and activated with 1:20 w/w trypsin (Sigma-Aldrich), for 16 h at 37°C. Purified Cry11Aa inclusions were solubilized in 100 mM NaOH and activated with 1:50 w/w trypsin for 2 h at 25°C. Toxins were dialyzed overnight in borate buffer (boric acid 0.05 M, NaOH 0.05 M and NaCl 0.15 M, pH 8.6). Toxins were biotin-labelled using biotinyl-N-hydroxysuccinimide ester according to the manufacturer's instructions (Amersham).

#### Mosquito larvae bioassay

Mosquitocidal bioassays with spore/crystal suspensions from *B. thuringiensis* strains producing only Cry4Ba, Cry4Aa, Cry11Aa and Cyt1Aa toxins were performed against *An. albimanus* fourth instar larvae in 100 ml of dechlorinated water. Positive (*Bti* strain) and negative controls (dechlorinated water) were included in the bioassay, and larvae were examined 24 h after treatment. The mean lethal concentration (LC<sub>50</sub>) was estimated by Probit analysis using statistical parameters after three independent assays (Finney, 1971).

#### Preparation of brush border membrane vesicles from *An. albimanus* larvae

Brush border membrane vesicles from dissected midguts of fourth instar *An. albimanus* larvae were prepared as reported and stored until used (Nielsen-LeRoux and Charles, 1992).

#### Phospholipase C-treatment of BBMV

*Anopheles albimanus* BBMV (300 µg) were suspended in 300 µl of PBS [45 mM NaCl, 2.8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O), 3.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O), pH 7.2] PI-PLC (phospholipase-C, 3 units) from *Bacillus cereus* (Boehringer-Mannheim) was added to the BBMV suspension and incubated for 90 min at 30°C, as previously reported (Lorence *et al.*, 1997).

#### Toxin blots

PI-PLC-treated BBMV proteins (10 µg) were separated in 1D or 2D 12% SDS-PAGE and electroblotted to PVDF Immobilon membranes (Amersham) at 350 mA by 45 min using transfer buffer (20% methanol, 25 mM Tris-base, 192 mM glycine). After blocking the membrane with 1% BSA, the membranes were incubated for 2 h with 10 nM of biotin-labelled Cry4Ba, Cry11Aa or Cry3Aa. Blots were washed three times using PBS containing 0.1% Tween-20. The bound protein was

detected by the use of streptavidin-peroxidase conjugate and developed with SuperSignal chemiluminescence substrate (Pierce).

#### Affinity chromatography purification of Cry4Ba binding proteins

Agarose-streptavidin (200 µl; Sigma-Aldrich) was incubated with 7 µg of biotinylated-Cry4Ba toxin overnight at 4°C. After incubation, the matrix was washed 10 times in PBS to remove any unbound protein. The solution containing GPI-anchored proteins (42 µg) was incubated in batch with 200 µl of Cry4Ba-agarose column and was washed four times with PBS, pH 7.6. The bound proteins were then eluted by boiling for 5 min in 100 µl of sample buffer [0.1% SDS (w/v), 10% glycerol (v/v), 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8 and 0.041% of bromophenol blue(w/v)]. After centrifugation, the supernatant was recovered and samples were stored at -20°C until used.

#### In-gel α-amylase assay

PI-PLC-treated BBMV proteins and Cry4Ba affinity chromatography purified proteins were run in a SDS-12% PAGE, at 4°C, 20 mA, for 75 min. The gel was washed three times with Triton X-100 for 20 min at room temperature and incubated with the substrate in the dark [100 mM citrate/phosphate, pH 6.5, 2 mM 4-methylumbelliferyl-α-D-glucopyranoside (Fluka)], at 37°C with gentle agitation until the signal was detected, and was visualized under UV light (Silva-Filha *et al.*, 1999).

#### 2D PAGE

A sample (10 µg) of PI-PLC-treated BBMV proteins was precipitated with 2D Clean Up Kit (GE Amersham Biosciences). For the first dimension, precipitated proteins were suspended in hydration buffer [8 M urea, 2% w/v CHAPS, 15 mM DTT and 0.5% v/v IPG buffer pH 3-10 (GE Amersham Biosciences)]. IEF was performed by use of IPG strips (7 cm, pH 3-10; GE Amersham Biosciences) that were hydrated overnight and focused for 4 h at 6500 V at 20°C under mineral oil. The IPG strips were first incubated for 10 min in equilibration buffer I [6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS and 1% DTT (w/v) in 0.05 M Tris-HCl buffer pH 8.8], and then with equilibration buffer II [6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS and 4% iodoacetamide (w/v) in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.8]. After equilibration, strips were electrophoresed in a 12% SDS-PAGE for the second dimension separation, by running at 15 mA, 4°C for 2 h. Protein spots were visualized by staining with colloidal Coomassie blue (Candiano *et al.*, 2004).

#### In-gel trypsin digestion

The protein was digested in-gel following a protocol by Shevchenko and colleagues (1996). The protein spot of interest was excised from a colloidal Coomassie blue stained SDS-PAGE and reduced with DTT, alkylated with iodoacetamide and in-gel digested with trypsin (Promega; Fitchburg, MA). After extraction with 50% v/v ACN and 5% v/v acetic acid, the

protein mixture was desalted with Zip Tip (Millipore; Billerica, MA, USA) and applied to the LC-MS/MS system.

#### LC-MS/MS analysis

Samples were applied into an ESI-IT LCQ mass spectrometer (Thermo Fisher; San José, CA) equipped with a nanospray source. At first, the fluid flow speed was 10 ml min<sup>-1</sup> and then it was reduced to 500 nl by means of a flow splitter (20 × 1), before the nanospray ionization system. The applied ionization voltage was 1.7 kV and the temperature of the heating capillary was maintained at 137°C. For the collisionally induced dissociation experiments, a nanospray capillary PicoFrit column (5 mm Biobasic C18, 300 Å pore; New Objective, Woburn, MA) was loaded with the protein digestion mixture, using a fragmentation source of 25 V and a collision energy normalized between 35% and 45%. The experiments were performed with the ion detection in the positive mode and the wideband activated. The MS/MS spectra from enzymatically generated peptides was analysed by using the SEQUEST software (Eng *et al.*, 1994).

#### Synthesis of cDNA, cloning and expression of a recombinant clone in *E. coli*

Total RNA from dissected midguts of fourth instar *An. albimanus* larvae were prepared with the RNeasy kit (Qiagen). By back-translating the sequence obtained by *de novo* sequencing of the 70 kDa protein spot (DITFEETQD PQAANTNPVYQQFTR) and by use of the *An. albimanus* codon usage (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=7167>), degenerate primers were designed for performing 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) experiments in order to clone the cDNA for the α-amylase using the SMART RACE cDNA Amplification kit (Clontech). The primers used were *Glu5* (AACTGCTGRTA SACKTCSGGGTTSGTGTTVGC) for 5' RACE and *Glu3* (ATYACSTTCGARGARACSCAGGAYCCSCAGGC) for 3' RACE (using the following code, R: A/G; S: C/G; Y: C/T; K: G/T; V: A/C/G). Both 5' and 3' RACE products were cloned into pCR2.1-TOPO (Invitrogen), to obtain plasmids p1.3–2 and p1SO-1, carrying inserts of 1.3 kb (5' RACE) and 0.75 kb (3' RACE) respectively. In order to complete the nucleotide sequence of both strands of DNA, primers *GluA* (CGACAGC CAGTACTACCTTCAC) and *GluB* (CCTCGTACACATGGT TGATCG) were used. These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number GQ344953.

For obtaining a clone to be expressed in *E. coli* that lacks the signal peptide and the GPI-anchoring site, a megaprimer method (Sarkar and SomMer, 1990) was followed to amplify a region from amino acids 24–582 of Amy1 protein. First, the clone containing the 5' RACE was used as a template for PCR amplification using primers Frag1a (GATCCGAATTCCG GCACCGGGCCGGCAGTGCAC, containing an EcoRI site that is shown underlined) and Frag1c (GAACTGCTGGTA CACGTCCGGGTTTCG). Amplification conditions were 94°C for 2 min, then 30 cycles (94°C for 30 s, 50°C for 1 min, 68°C for 1 min) followed by an extension at 68°C for 10 min, using Advantage2 Polymerase (Clontech). The resultant amplicon

was gel purified by minElute PCR purification kit (Qiagen) and used as a 'megaprimer' on a second amplicon that was obtained using as template the clone containing the 3' RACE using primers Frag2D (ACATTACGTTTCGAGGAGACGCAG GAC) and Frag2C (TCGATGCGGCCGCTGGAATCT CAAACACAACCGCATCG, containing a NotI cleavage site that is shown underlined). Amplification conditions were 94°C for 2 min, then 30 cycles (94°C for 30 s, 60°C for 1 min, 68°C for 1 min) followed by an extension at 68°C for 10 min, using Vent Polymerase (New England Biolabs). Both amplicons were gel purified by minElute PCR purification kit (Qiagen). Finally, a third PCR reaction was performed using both amplicons that overlap by 68 bp (from nucleotides 1270 to 1337, which code for amino acids 406–428 of the Amy1 protein sequence shown in Fig. 4). First, both amplicons were annealed at 55°C for 10 min, extended at 68°C for 10 min and amplified by using Frag1a-Frag2C primers and Advantage2 Polymerase. Amplification conditions were 94°C for 2 min, then 30 cycles (94°C for 30 s, 55°C for 1 min, 68°C for 3 min) followed by an extension at 68°C for 10 min. The resultant amplicon of 1.7 kb was digested with enzymes EcoRI and NotI and cloned into pGEX-4T-3 (GE Amersham Biosciences), digested with the same enzymes.

#### Expression of the recombinant construct pAmy1 in *E. coli*

For expression in *E. coli*, plasmid pAmy1 that codes for Amy1 protein devoid of signal peptide and the sequence downstream of the GPI-anchoring site was transformed into strain JM101 (New England Biolabs). From a single colony, a 5 ml overnight culture was grown on LB Amp. The next day, 20 ml of LB Amp was inoculated with 2 ml of the overnight culture and grown for 3 h. Then, IPTG was added to a final concentration of 0.1 mM and incubated for 2 h at 37°C and 180 r.p.m. Cells were centrifuged at 20 800 g for 15 min at 4°C. The cells were suspended by vortex in 5 ml of Nonidet-40 (Sigma). The solution was incubated at room temperature for 10 min. After incubation, the solution was centrifuged for 15 min at 20 800 g and 4°C. The pellet was suspended in 4 ml of PBS. Protein samples (5 µg) were run in a PAGE-SDS 12% acrylamide gel at 30 mA. Finally, the gel was electroblotted to PVDF membranes and analysed by ligand blot with biotin-labelled Cry4Ba, Cry11Aa or Cry3Aa toxins.

#### Binding specificity of the recombinant protein

A sample of 5 µg of the insoluble fraction of an *E. coli* extract containing the recombinant protein was run in a PAGE-SDS 12% acrylamide gel at 30 mA and electroblotted to PVDF membranes, which were incubated with 10 nM of biotin-labelled Cry4Ba toxin in the presence or absence of 500 nM of unlabelled Cry4Ba toxin.

#### Bioinformatic analysis

Blast-p searches were done in the Blast server (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul *et al.*, 1997). For the predic-

tion of the N-terminal signal sequence, we used the program SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Bendtsen *et al.*, 2004). Prediction of potential C-terminal GPI modification sites was done with big-PI predictor ([http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html)) (Eisenhaber *et al.*, 1999). Asparagines that could potentially be N-glycosylated were predicted using the program NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) (Blom *et al.*, 2004).

### Acknowledgements

The authors wish to thank Claudia Perez, Pedro Romero and Victoria Pando for technical assistance, to Cesar Batista, Oscar Villa Hernandez and Lorena Hernandez Orihuela for LC/MS-MS analysis, and to Eugenio Lopez and Paul Gaytan for oligonucleotide synthesis. We also thank Dr Maria Helena Silva-Filha for her advice in setting up the  $\alpha$ -glucosidase assays. This work was partially supported by DGAPA, UNAM contracts IN204707 and IN210208, CONACYT 81639 and NIH 1R01 AI066014. M.T.F.L. thankfully acknowledges a PhD fellowship from CONACYT, Mexico.

### References

Abdullah, M.A., Valaitis, A.P., and Dean, D.H. (2006) Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochem* **7**: 16.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402.

Bayyareddy, K., Andacht, T.M., Abdullah, M.A., and 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.

Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**: 783–795.

Berry, C., O'Neil, S., Ben-Dov, E., Jones, A.F., Murphy, L., Quail, M.A., *et al.* (2002) Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5082–5095.

Blom, N., Sicheritz-Ponten, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* **4**: 1633–1649.

Bravo, A., Gomez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sanchez, J., Zhuang, M., *et al.* (2004) Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction with membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta* **1667**: 38–46.

Bravo, A., Gill, S.S., and Soberon, M. (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **49**: 423–435.

Breman, J.G., Alilio, M.S., and Mills, A. (2004) Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary. *Am J Trop Med Hyg* **71** (Suppl. 2): 1–15.

Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggi, G.M., Carnemolla, B., *et al.* (2004) Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**: 1327–1333.

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, J., Aimanova, K.G., Fernandez, L.E., Bravo, A., Soberon, M., and Gill, S.S. (2009) *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biochem J* **424**: 191–200.

Crickmore, N., Bone, E.J., Williams, J.A., and Ellar, D.J. (1995) Contribution of the individual components of the endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiol Lett* **131**: 249–254.

Delecluse, A., Poncet, S., Klier, A., and Rapoport, G. (1993) Expression of cryIVA and cryIVB genes, independently or in combination, in a crystal-negative strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl Environ Microbiol* **59**: 3922–3927.

Eisenhaber, B., Bork, P., and Eisenhaber, F. (1999) Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences. *J Mol Biol* **292**: 741–758.

Eng, J.K., McCormack, A.L., and Yates, J.R., 3rd (1994) An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom* **5**: 976–989.

Fernandez, L.E., Aimanova, K.G., Gill, S.S., Bravo, A., and Soberon, M. (2006) A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem J* **394**: 77–84.

Fernandez, L.E., Martinez-Anaya, C., Lira, E., Chen, J., Evans, A., Hernandez-Martinez, S., *et al.* (2009) Cloning and epitope mapping of Cry11Aa-binding sites in the Cry11Aa-receptor alkaline phosphatase from *Aedes aegypti*. *Biochemistry* **48**: 8899–8907.

Finney, D. (1971) Chapter 8, The toxic action of mixtures of poison. In *Probit Analysis*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, pp. 50–80.

Gomez, I., Sanchez, J., Miranda, R., Bravo, A., and Soberon, M. (2002) Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix  $\alpha$ -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett* **513**: 242–246.

Gomez, I., Arenas, I., Benitez, I., Miranda-Rios, J., Becerril, B., Grande, G., *et al.* (2006) Specific epitopes of Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. *J Biol Chem* **281**: 34032–34039.

Hua, G., Zhang, R., Abdullah, M.A., and Adang, M.J. (2008) *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment

- of AgCad1 synergizes toxicity. *Biochemistry* **47**: 5101–5110.
- Ibarra, J.E., del Rincon, M.C., Orduz, S., Noriega, D., Benintende, G., Monnerat, R., et al. (2003) Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5269–5274.
- Janeček, S. (1997)  $\alpha$ -Amylase family: molecular biology and evolution. *Progr Biophys Molec Biol* **67**: 67–97.
- Jurat-Fuentes, J.L., and Adang, M.J. (2004) Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur J Biochem* **271**: 3127–3135.
- Knight, P.J., Crickmore, N., and Ellar, D.J. (1994) The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA (c)  $\delta$ -endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol Microbiol* **11**: 429–436.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M., and Chaufaux, J. (1995) Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* spo0A mutant. *Biotechnology* **13**: 67–71.
- Liang, Y., Patel, S.S., and Dean, D.H. (1995) Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *J Biol Chem* **270**: 24719–24724.
- Likitvivanavong, S., Katzenmeier, G., and Angsuthanasombat, C. (2006) Asn183 in  $\alpha 5$  is essential for oligomerization and toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin. *Arch Biochem Biophys* **445**: 46–55.
- Lorence, A., Darszon, A., and Bravo, A. (1997) Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes. *FEBS Lett* **414**: 303–307.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Chistas, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., et al. (2009) CDD: specific functional annotation with the conserved domain database. *Nucleic Acids Res* **37(D)**: 205–210.
- Nielsen-LeRoux, C., and Charles, J.F. (1992) Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. *Eur J Biochem* **210**: 585–590.
- Opota, O., Charles, J.-F., Tarot, S., Pauron, D., and Darboux, I. (2008) Identification and characterization of the receptor from the *Bacillus sphaericus* binary toxin in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Comp Biochem Physiol B* **149**: 419–427.
- Pardo-Lopez, L., Gomez, I., Rausell, C., Sanchez, J., Soberon, M., and Bravo, A. (2006) Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by *N*-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. *Biochemistry* **45**: 10329–10336.
- Perez, C., Fernandez, L.E., Sun, J., Folch, J.L., Gill, S.S., Soberon, M., and Bravo, A. (2005) *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 18303–18308.
- Perez, C., Muñoz-Garay, C., Portugal, L., Sanchez, J., Gill, S.S., Soberon, M., and Bravo, A. (2007) *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. *Cell Microbiol* **9**: 2931–2937.
- Poncet, S., Delecluse, A., Klier, A., and Rapoport, G. (1995) Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB and CryIVD toxic components of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *J Invertebr Pathol* **66**: 131–135.
- Rausell, C., Muñoz-Garay, C., Miranda-CassoLuengo, R., Gomez, I., Rudiño-Piñera, E., Soberon, M., and Bravo, A. (2004) Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. *Biochemistry* **43**: 166–174.
- Revina, L.P., Kostina, L.I., Ganushkina, L.A., Mikhailova, A.L., Zalunin, I.A., and Chestukhina, G.G. (2004) Reconstruction of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry11A endotoxin from fragments corresponding to its N- and C-moieties restores its original biological activity. *Biochemistry (Moscow)* **69**: 181–187.
- Romao, T.P., De Melo Chalegre, K.D., Key, S., Junqueira Ayres, C.F., Fontes de Oliveira, C.M., de Melo Neto, O.P., and Silva-Filha, M.H. (2006) A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its  $\alpha$ -glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. *FEBS J* **273**: 1556–1568.
- Sarkar, G., and SomMer, S.S. (1990) The 'megaprimer' method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques* **8**: 404–407.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**: 850–858.
- Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., and Charles, J.-F. (1999) Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Insect Biochem Mol Biol* **29**: 711–721.
- Soberon, M., Fernandez, L.E., Perez, C., and Bravo, A. (2007) Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon* **49**: 597–600.
- Stam, M.R., Danchin, E.G., Rancurel, C., Coutinho, P.M., and Henriessat, B. (2006) Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of  $\alpha$ -amylase-related proteins. *Protein Eng Des Sel* **19**: 555–562.
- Thiery, I., Delecluse, A., Tamayo, M.C., and Orduz, S. (1997) Identification of a gene for Cyt1A-like hemolysin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and expression in a crystal-negative *B. thuringiensis* strain. *Appl Environ Microbiol* **63**: 468–473.
- Thomas, W.E., and 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.
- Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, I., Ji, T.H., 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.
- WHO (1996) Chapter 1: The state of world health. *Insect-borne diseases*. In *The World Health Report 1996 – Fighting Disease, Fostering Development*. Geneva, Switzerland: WHO, pp. 46–56.

- Wolfersberger, M.G. (1990) The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. *Experientia* **46**: 475–477.
- Wu, D., and Federeci, B.A. (1995) Improved production of the insecticidal CryIVD protein in *Bacillus thuringiensis* using *cryIA (c)* promoters to express the gene for an associated 20-kDa protein. *Appl Microbiol Biotechnol* **42**: 697–702.
- Wu, D., Johnson, J.J., and Federeci, 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.

**CONTRIBUCIÓN ORIGINAL <sup>2</sup>**

**Single concentration tests show synergism among *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins against the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus*.**

**Fernández-Luna MT, Tabashnik BE, Lanz-Mendoza H, Bravo A, Soberón M,  
Miranda-Ríos J.**

***J Invertebr Pathol.* 2010 Mar 31. Article in Press [doi:10.1016/j.jip.2010.03.007](https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.03.007)**

## RESÚMEN

El método más empleado a la fecha para el análisis del sinergismo entre varias toxinas se basa en una comparación entre los valores esperados y los observados para la dosis letal del 50% de los insectos probados ( $DL_{50}$ ). En este reporte se describe y aplica un método nuevo que permite analizar el sinergismo basado en concentraciones únicas de cada toxina. Utilizando este nuevo método se encontró que la proteína citolítica Cyt1Aa, la cual forma parte del cristal de *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis*, no es tóxica *per se* en contra de larvas del mosquito vector de la malaria *Anopheles albimanus*. Sin embargo, es capaz de sinergizar la toxicidad de las proteínas cristalinas Cry4Ba y Cry11Aa, también presentes en el cristal de *Bti*. Cabe mencionar que también se encontró un comportamiento sinérgico entre las actividades de las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa, similar a lo reportado con anterioridad. A la fecha se desconocen los mecanismos moleculares que expliquen el sinergismo observado en *An. albimanus* por la proteína Cyt1Aa y las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa, así como el manifestado por las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa.





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Invertebrate Pathology

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

## Short Communication

Single concentration tests show synergism among *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins against the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus*María Teresa Fernández-Luna<sup>a</sup>, Bruce E. Tabashnik<sup>b</sup>, Humberto Lanz-Mendoza<sup>c</sup>, Alejandra Bravo<sup>a</sup>, Mario Soberón<sup>a</sup>, Juan Miranda-Ríos<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Depto. de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca 62250, Morelos, Mexico<sup>b</sup> Department of Entomology, University of Arizona, Tucson, AZ 85721, United States<sup>c</sup> Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca 62508, Morelos, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 16 November 2009

Accepted 26 March 2010

Available online xxx

## Keywords:

Malaria

Synergism

*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis**Anopheles albimanus*

Cry4Ba

Cry11Aa

Cyt1Aa

## ABSTRACT

Bioassays of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* with larvae of the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* showed that the cytolytic protein Cyt1Aa was not toxic alone, but it increased the toxicity of the crystalline proteins Cry4Ba and Cry11Aa. Synergism also occurred between Cry4Ba and Cry11Aa toxins. Whereas many previous analyses of synergism have been based on a series of toxin concentrations leading to comparisons between expected and observed values for the concentration killing 50% of insects tested (LC<sub>50</sub>), we describe and apply a method here that enables testing for synergism based on single concentrations of toxins.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* are used widely to control insects that attack crops and transmit diseases. Whereas resistance to *B. thuringiensis* toxins has been documented in field populations of at least five species of lepidopteran pests of crops (Matten et al., 2008; Monsanto, 2010; Tabashnik, 1994; Tabashnik et al., 2008, 2009; Van Rensburg, 2007), we are not aware of any reported cases of field-evolved resistance to *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins used to control dipteran vectors of disease. Wirth et al. (2005) suggested that synergistic interactions between the naturally occurring combinations of crystalline (Cry) and cytolytic (Cyt) toxins in *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* have delayed insect resistance.

Synergism between the Cry and Cyt toxins of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* has been demonstrated against the disease-transmitting mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Crickmore et al., 1995; Hernández-Soto et al., 2009; Pérez et al., 2005; Promdonkoy et al., 2005; Tabashnik, 1992; Wu and Chang, 1985; Wu et al., 1994). However, synergism between Cry and Cyt toxins has not been examined previously in *Anopheles* mosquitoes that

transmit malaria, which causes approximately one million deaths annually (Greenwood et al., 2008). Here we used bioassays to evaluate synergism among the *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins Cry4Ba, Cry11Aa, and Cyt1Aa against *Anopheles albimanus*, an important vector of malaria that occurs from the southern US to northern Peru (Bejarano, 2003).

In many previous studies of synergism among *B. thuringiensis* toxins, statistical analysis of bioassay data has been based on comparisons between expected and observed values for the concentration killing 50% (LC<sub>50</sub>) of the insects tested as described by Tabashnik (1992), or the underlying statistical model has not been specified. Although the method of Tabashnik (1992) is useful, it requires LC<sub>50</sub> values based on results from a series of concentrations of each component in a mixture and of the mixture. Here we describe and apply a complementary statistical method that enables testing for synergism with bioassay data from only a single concentration of each component in a mixture and the mixture itself.

We performed bioassays with spore/crystal suspensions from three *B. thuringiensis* strains that each produce only Cry4Ba, Cry11Aa or Cyt1Aa protoxin as previously reported (Fernández-Luna et al., 2010). Although protoxins were used in all bioassays, they are referred to hereafter as “toxins” for brevity. In the current study, mosquitoes were reared on a 10% sugar solution, 28 °C, 75% humidity and a 12 h:12 h light:dark photoperiod. For bioassays, groups of 15 4th-instar larvae were put in 250-ml plastic cups.

\* Corresponding author. Present address: Unidad de Genética de la Nutrición, Depto. de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and Instituto Nacional de Pediatría, México DF 04510, Mexico.

E-mail address: [riosjuanm@biomedicas.unam.mx](mailto:riosjuanm@biomedicas.unam.mx) (J. Miranda-Ríos).

The spore/crystal suspension was added to 100 ml of water and gently mixed. Mortality was scored after 24 h by gently probing larvae for movement. Four replicates with 15 larvae per replicate were assayed in each treatment (total  $n = 60$  larvae per treatment), with two replicates started on one date and the other two started on a separate date.

We evaluated synergism by testing for deviation from the null hypothesis of simple independent action (Finney, 1971), which assumes the proportion of larvae surviving exposure to a mixture of toxins is the product of the proportions of larvae that survive exposure to each of the toxins separately. For example, with two toxins  $a$  and  $b$ :

$$S_{(ab)EXP} = S_{(a)OBS} \times S_{(b)OBS} \quad (1)$$

where  $S_{(ab)EXP}$  is the proportion of larvae expected to survive exposure to a mixture of toxins  $a$  and  $b$ ,  $S_{(a)OBS}$  is the observed proportion of larvae that survived exposure to toxin  $a$ , and  $S_{(b)OBS}$  is the observed proportion of larvae that survived exposure to toxin  $b$ . We calculated expected mortality for larvae exposed to the mixture of toxins  $a$  and  $b$  as  $(1 - S_{(ab)EXP}) \times 100\%$ . We calculated the expected numbers of dead and live larvae by multiplying the expected mortality and survival rates by the sample size used when each toxin was tested separately ( $n = 60$  for each toxin). We used Fisher's exact test (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency2.cfm>) to determine if a significant difference occurred between the observed and expected numbers of dead and live larvae. Because we hypothesized that synergism would cause the number of dead larvae exposed to the mixture to be higher for observed than expected, we used a one-tailed test. We applied the same approach to test for synergism among three toxins:

$$S_{(abc)EXP} = S_{(a)OBS} \times S_{(b)OBS} \times S_{(c)OBS} \quad (2)$$

where  $S_{(abc)EXP}$  is the proportion of larvae expected to survive exposure to a mixture of toxins  $a$ ,  $b$ , and  $c$ .

The results show that synergism occurred in all mixtures of two or three toxins tested (Table 1). At 43 ng toxin per ml, mortality was 6.6% with Cry4Ba alone and 0% with Cry11Aa alone (Table 1). Cyt1Aa alone was not toxic to *An. albimanus* at 90, 180 or 360 ng per ml (Table 1). To determine if the Cyt1Aa preparation contained functional toxin, we tested it against 4th instar larvae of *Ae. aegypti* and found that it was as toxic as reported previously by Pérez et al. (2005). Both Cry4Ba and Cry11Aa were synergized by all four concentrations of Cyt1Aa tested (21.5, 43, 86, and 172 ng Cyt1Aa per ml). Mortality caused by the mixture of Cry4Ba and Cyt1Aa was much greater at the highest concentration of Cyt1Aa (76.7%) than at the lowest concentration of Cyt1Aa (33.3%). However, the variation in mortality was smaller across the four concentrations of Cyt1Aa for the mixture of Cry11Aa and Cyt1Aa (range = 28.3–38.3%) and for the mixture of all three toxins (range = 70.0–83.3%). The observed mortality (56.7%) was higher than expected mortality (6.6%) for the mixture of Cry4Ba and Cry11Aa, indicating synergism also occurred between these two toxins.

Results here with *An. albimanus* indicating that both Cry4Ba and Cry11Aa were synergized by Cyt1Aa provide the first evidence of synergism between Cry and Cyt toxins against an anopheline mosquito. The results here also confirm previous work with *An. albimanus* showing that when tested individually,  $LC_{50}$  values (ng toxin per ml) were 130 for Cry4Ba and 900 for Cry11Aa, but Cyt1Aa was not toxic at 10,000 ng per ml (Fernández-Luna et al., 2010). In contrast,  $LC_{50}$  values of Cyt toxins were 60–1245 ng per ml when tested alone against *Ae. aegypti* and *C. quinquefasciatus* (Crickmore et al., 1995; Hernández-Soto et al., 2009; Pérez et al., 2005; Promdonkoy et al., 2005; Tabashnik, 1992; Wu et al., 1994). The results here imply that even though Cyt1Aa has no toxicity by itself

**Table 1**

Synergism among *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins, Cry4Ba, Cry11Aa, and Cyt1Aa against 4th instars of *Anopheles albimanus*.

Toxin set	Concentration (ng per ml)	Mortality	
		Expected	Observed <sup>a</sup>
Cry4Ba	0	NA <sup>b</sup>	0
	17.3	NA	3.3
	43	NA	6.6
	86.8	NA	23.3
Cry11Aa	0	NA	0
	43	NA	0
	90	NA	3
	180	NA	16.6
	360	NA	33.3
Cyt1Aa	0	NA	0
	90	NA	0
	180	NA	0
	360	NA	0
Cry4Ba + Cry11Aa	43/43	6.6	56.7
Cry4Ba + Cyt1Aa	43/21.5	6.6	33.3
Cry4Ba + Cyt1Aa	43/43	6.6	65
Cry4Ba + Cyt1Aa	43/86	6.6	56.7
Cry4Ba + Cyt1Aa	43/172	6.6	76.7
Cry11Aa + Cyt1Aa	43/21.5	0	36.7
Cry11Aa + Cyt1Aa	43/43	0	35
Cry11Aa + Cyt1Aa	43/86	0	28.3
Cry11Aa + Cyt1Aa	43/172	0	38.3
Cry4Ba + Cry11Aa + Cyt1Aa	43/43/21.5	6.6	83.3
Cry4Ba + Cry11Aa + Cyt1Aa	43/43/43	6.6	83.3
Cry4Ba + Cry11Aa + Cyt1Aa	43/43/86	6.6	75
Cry4Ba + Cry11Aa + Cyt1Aa	43/43/172	6.6	70

<sup>a</sup> Each value for observed mortality represents results from four replicates of 15 larvae per replicate ( $n = 60$ ). Observed mortality was significantly greater than expected mortality for each toxin mixture tested (Fisher's exact test,  $P < 0.001$  for each comparison).

<sup>b</sup> Not applicable; expected mortality was not calculated for single toxins.

against *An. albimanus*, it can synergize Cry4Ba and Cry11Aa against this mosquito.

As far as we know, the data reported here for *An. albimanus* provide the first example in which Cry proteins are synergized against a species of mosquito by a functional Cyt protein that is not toxic by itself to the same species of mosquito. Although our Cyt1Aa preparation was not toxic to *An. albimanus*, it had the expected toxicity against *Ae. aegypti*. Thus, we can exclude the hypothesis that the Cyt1Aa was inactivated during purification, which apparently accounts for some early reports that Cyt toxins were not toxic to some *Culex* or *Aedes* mosquitoes (Wu et al., 1994).

The results here showing synergism between Cry4Ba and Cry11Aa against *An. albimanus* are consistent with previous results showing synergism between these two toxins against *Anopheles stephensi* and *Culex pipiens* (Poncet et al., 1995). However, against *Ae. aegypti*, synergism between these toxins was seen in one study (Crickmore et al., 1995), but not in another (Poncet et al., 1995).

In sum, the results here establish that, similar to results with other mosquitoes, synergism occurs among *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins against *An. albimanus*. Whereas synergism between Cyt1Aa and Cry11Aa occurs in *Ae. aegypti* larvae because Cyt1Aa acts as a receptor for Cry11Aa (Pérez et al., 2005), we do not know if this is the mechanism of synergism between Cry and Cyt toxins against *An. albimanus*. Because the toxicity of Cyt1Aa alone was higher for *Ae. aegypti* (Crickmore et al., 1995; Hernández-Soto et al., 2009; Pérez et al., 2005; Promdonkoy et al., 2005; Tabashnik, 1992; Wu et al., 1994) than for *An. albimanus*, the mechanism of synergy might differ between these species. In addition, our results with *An. albimanus* show that the effect of Cyt1Aa concentration on synergism differed between Cry4Ba and Cry11Aa,

suggesting that the mechanism of synergism could also differ between these two toxin combinations. In any case, the results reported here demonstrate that Cry and Cyt toxins act synergistically against *An. albimanus* and thus combinations of these toxins may be especially useful for sustainable control of this important vector of malaria.

#### Acknowledgments

We acknowledge the technical assistance of Martha Elva Pérez Andrade and Pedro Romero. Support was provided by DGAPA, PAPIIT, UNAM Contract IN204707, and by USDA-National Research Initiative Grant 2008-35302-0390. MTLF thankfully acknowledges a Ph.D. fellowship from CONACYT, México.

#### References

- Bejarano, E.E., 2003. Occurrence of the malaria vector *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae) in Isla Fuerte, Colombia. *Neotrop. Entomol.* 32, 517–518.
- Crickmore, N., Bone, E.J., Williams, J.A., Ellar, D.A., 1995. Contribution of the individual components of the  $\delta$ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 131, 249–254.
- Fernández-Luna, M.T., Lanz-Mendoza, H., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M., Miranda-Ríos, J., 2010. An  $\alpha$ -amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Environ. Microbiol.* 12, 746–757.
- Finney, D., 1971. *Probit Analysis*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, pp. 50–80.
- Greenwood, B.M., Fidock, D.A., Kyle, D.E., Kappe, S.H.I., Alonso, P.L., Collins, F.H., Duffy, P.E., 2008. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J. Clin. Invest.* 118, 1266–1276.
- Hernández-Soto, A., Del Rincón-Castro, M.C., Espinoza, A.M., Ibarra, J.E., 2009. Parasporal body formation via overexpression of the Cry10Aa toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, and Cry10Aa–Cyt1Aa synergism. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4661–4667.
- Matten, S.R., Head, G.P., Quemada, H.D., 2008. How governmental regulation can help or hinder the integration of Bt crops into IPM programs. In: Romeis, J., Shelton, A.M., Kennedy, G.G. (Eds.), *Integration of Insect-resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs*. Springer, New York, pp. 27–39.
- Monsanto, 2010. Cotton in India. <[http://www.monsanto.com/monsanto\\_today/for\\_the\\_record/india\\_pink\\_bollworm.asp](http://www.monsanto.com/monsanto_today/for_the_record/india_pink_bollworm.asp)> (accessed 13.03.10).
- Pérez, C., Fernández, L.E., Sun, J., Folch, J.L., Gill, S.S., Soberón, M., Bravo, A., 2005. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt11Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 18303–18308.
- Poncet, S., Delécluse, A., Klier, A., Rapoport, G., 1995. Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB and CryIVD toxic components of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *J. Invertebr. Pathol.* 66, 131–135.
- Promdonkoy, B., Promdonkoy, P., Panyim, S., 2005. Co-expression of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cyt2Aa2 in *Escherichia coli* revealed high synergism against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae. *FEMS Microbiol. Lett.* 252, 121–126.
- Tabashnik, B.E., 1992. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3343–3346.
- Tabashnik, B.E., 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 39, 47–79.
- Tabashnik, B.E., Gassmann, A.J., Crowder, D.W., Carrière, Y., 2008. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nat. Biotechnol.* 26, 199–202.
- Tabashnik, B.E., Van Rensburg, J.B.J., Carrière, Y., 2009. Field-evolved insect resistance to *Bacillus thuringiensis* crops: definition, theory, and data. *J. Econ. Entomol.* 102, 2011–2025.
- Van Rensburg, J.B.J., 2007. First report of field resistance by stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. *S. Afr. J. Plant Soil* 24, 147–151.
- Wirth, M.C., Park, H.-W., Walton, W.E., Federici, B.A., 2005. Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 185–189.
- Wu, D., Chang, F.N., 1985. Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal. *FEBS Lett.* 190, 232–236.
- Wu, D., Johnson, J.J., Federici, B.A., 1994. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 13, 965–972.

## 11.- DISCUSIÓN y PERSPECTIVAS

El cristal producido por la bacteria *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis*, el cual está formado por las toxinas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa y Cyt2Ba, es muy tóxico en contra de diferentes especies de mosquitos tales como *Aedes spp.*, *Culex spp.*, y *Anopheles spp.*, vectores de graves enfermedades en humanos (Schnepf *et al.*, 1998). Sin embargo, el mecanismo mosquitocida del cristal de *Bti* se desconoce en la actualidad. En este trabajo se inició la determinación del mecanismo de acción del cristal de *Bti* en contra del mosquito *An. albimanus*, para lo cual se realizó un análisis de la mortalidad provocada por sus toxinas componentes de manera individual, así como por el efecto de la interacción entre cada una de ellas en contra de este mosquito, el cual es un vector de malaria que se encuentra desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Perú (Bejarano, E.E., 2003).

Aunque el DDT ya no se está aplicando para el control de vectores desde el año 2000 y su uso agrícola fue prohibido desde los años setenta, todavía es posible detectar niveles elevados de resistencia a dicho insecticida. En México, el uso del DDT fue sustituido por piretroides después de haberse usado por casi medio siglo y en la actualidad se utiliza la deltametrina como primera opción. Sin embargo, en un estudio realizado en el año 2007, se demostró la resistencia tanto al DDT como a la deltametrina en *An. albimanus* colectados en el sur de la Península de Yucatán y en Tabasco, así como en los actuales focos residuales de transmisión de paludismo en el Estado de México, Sinaloa, Nayarit, Michoacán, Oaxaca y Chiapas (Dzul *et al.*, 2007). También se documentó la resistencia a metil pirimifos en *An. albimanus* en Chiapas (Dzul *et al.*, 2007). Estos datos hacen necesario un cambio en la estrategia de combate a los mosquitos. Sería deseable que esta nueva estrategia esté basada en un control de tipo biológico, que no dañe el medio ambiente y que no genere resistencia en los mosquitos, la cual bien pudiera estar basada en el uso de *Bti*.

Aún cuando ya se había reportado la susceptibilidad de *An. albimanus* al cristal sintetizado por *Bti* (Ibarra, *et al.*, 2003), no se había evaluado la contribución de cada una de las toxinas componentes del cristal a la toxicidad mostrada por el mismo. Los ensayos de

toxicidad mostraron que las proteínas Cry4Ba y Cry11Aa de *Bti* son los componentes que de manera individual presentan una mayor toxicidad en contra de larvas de *An. albimanus* (Fernández-Luna, *et al.*, 2010a). Por otra parte y en contraste con lo reportado para la toxina Cyt1Aa en *Ae. aegypti*, *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus*, *An. gambiae* y *An. stephensi* (Konit y Ellar, 1994., Juárez-Pérez, *et al.*, 2002), se encontró que la toxina Cyt1Aa *per se* no es tóxica en contra de *An. albimanus*, aún a dosis muy altas (Fernández-Luna, *et al.*, 2010a). Este dato sugiere fuertemente que para el caso de *An. albimanus*, los mecanismos de toxicidad planteados para la acción de la Cyt1Aa, como son la formación de poros ó una acción tipo detergente sobre la membrana, pudieran no ser operantes en este mosquito (Knowles, *et al.*, 1989; Manceva, *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que la actividad tóxica de ciertas combinaciones de las toxinas producidas por *Bti* en contra de larvas de mosquitos, es mayor que la esperada a partir de la actividad de las fracciones individuales, fenómeno al que se ha denominado sinergismo (Ben-Dov, *et al.*, 1995; Crickmore, *et al.*, 1995; Tabashnik, B.E., 1992; Wu y Chang, 1985). En este trabajo, mediante bioensayos con las proteínas insecticidas de *Bti* en contra de larvas de *An. albimanus*, se demostró que aún cuando la proteína citolítica Cyt1Aa no es tóxica por sí sola, es capaz de sinergizar la toxicidad de las proteínas Cry4Ba y Cry11Aa (Fernández-Luna *et al.*, 2010b), un fenómeno que se reportó con anterioridad en *Ae. aegypti* (Crickmore *et al.*, 1995).

En el caso de *Ae. aegypti*, la toxina Cyt1Aa, además de causar mortalidad en este mosquito de manera individual, es capaz de sinergizar el efecto de las toxinas Cry4Aa, Cry4Ba y Cry11Aa (Crickmore, *et al.*, 1995). Para explicar el sinergismo entre las toxinas Cry11Aa y Cyt1Aa en contra de *Ae. aegypti*, se propuso que la Cyt1Aa se inserta en la membrana y expone epítopes de unión que le permiten funcionar como un receptor de la toxina Cry11Aa (Pérez, *et al.*, 2005). Dado que en *An. albimanus* la proteína Cyt1Aa no es tóxica *per se*, y, por lo tanto, probablemente no forma poros en la membrana, proponemos el siguiente mecanismo de sinergismo entre ésta y cada una de las proteínas Cry4Ba y Cry11Aa en este mosquito: la Cyt1Aa promueve la oligomerización de las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa en solución, sin necesidad de insertarse y formar poros en las membranas. Parte

de esta propuesta se basa en la observación realizada por Pérez *et al.* (2007), de que la Cyt1Aa favorece la oligomerización de la Cry11Aa *in vitro*. Una manera de poner a prueba este modelo pudiera ser mediante el uso de toxinas Cyt1Aa mutantes en el epítipo que le permite interactuar con las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa.

Otro dato muy interesante que aquí se reporta es la existencia de sinergismo entre las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa (Fernández-Luna *et al.*, 2010b). Aunque un fenómeno similar se observó para esta combinación de toxinas Cry en *Ae. aegypti* (Crickmore *et al.*, 1995), el grado de sinergismo encontrado en *An. albimanus* es aproximadamente 4 veces mayor al reportado en *Ae. aegypti* (Fernández-Luna *et al.*, 2010b). A la fecha se desconoce el mecanismo molecular involucrado que explique el sinergismo presentado entre toxinas Cry, aunque una posibilidad es la formación de un heterooligómero conformado por Cry4Ba y Cry11Aa, cuya existencia deberá de confirmarse experimentalmente. De esta manera, es evidente que la toxicidad mostrada por *Bti* es un fenómeno complejo que resulta de la suma de varias interacciones, entre ellas las observadas entre Cyt-Cry, Cry-Cry y las Cry con sus receptores.

La selectividad de las toxinas Cry por sus insectos blanco está determinada tanto por los receptores o proteínas de unión a la toxina, presentes en el intestino, así como por dominios específicos a través de los cuales estas toxinas interactúan con sus receptores. Las interacciones con el receptor constituyen un determinante importante de la especificidad de las toxinas Cry; por esta razón, una parte importante de la investigación sobre las toxinas Cry se ha centrado tanto en la identificación como en la validación de los posibles receptores. Los receptores de las toxinas Cry con actividad contra lepidópteros descritos a la fecha incluyen a las proteínas del tipo Caderina, APN y FA (Gahan *et al.*, 2001; Vadlamudi *et al.*, 1993; Jurat-Fuentes y Adang, 2004; Gill *et al.*, 1995; Knight *et al.*, 1994). En el caso de las toxinas Cry mosquitocidas, se ha identificado la unión de la Caderina a Cry4Ba, Cry11Ba y Cry11Aa (Hua *et al.*, 2008; Likitvivatanavong *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2009a), la unión de la APN a Cry11Ba (Abdullah *et al.*, 2006) y de la FA a Cry11Aa (Fernández *et al.*, 2006).

En el caso de *An. albimanus*, nuestro grupo reportó que, de manera contraria a lo esperado, es una  $\alpha$ -amilasa la que funciona como el receptor putativo de las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa (Fernández-Luna *et al.*, 2010a). Este descubrimiento representa el primer ejemplo de una  $\alpha$ -amilasa que funciona como receptor de las toxinas Cry. Al igual que otros receptores identificados para las toxinas Cry como la APN y la FA, ésta  $\alpha$ -amilasa está anclada a la membrana por GPI (Fernández-Luna *et al.*, 2010a). Debido a que la identificación de este receptor en *An. albimanus* se realizó a partir de proteínas ancladas por GPI, desconocemos si existe otro receptor presente en la membrana, pero que no se encuentre anclado por GPI, como podría ser la Caderina. La búsqueda de otros receptores para las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa presentes en el intestino de las larvas de *An. albimanus* representa otro desafío experimental que surge de este trabajo.

El modelo de formación de poro propone un mecanismo de interacción secuencial de las toxinas Cry con los diferentes receptores presentes en la membrana de las células del intestino de los insectos blanco (Bravo *et al.*, 2004). Se cree que el papel de cada una de las interacciones toxina-receptor es facilitar los cambios necesarios para que la toxina pase de una conformación monomérica en estado soluble al de un oligómero insertado en la membrana. Según este modelo, es probable que las toxinas Cry mosquitocidas se unan inicialmente a la caderina como toxinas monoméricas. Posteriormente, una vez en estado oligomérico, la toxina se uniría a un segundo receptor anclado a la membrana mediante GPI (Soberón *et al.*, 2007), como la APN, la FA o la  $\alpha$ -amilasa reportada en la presente tesis (Fernández-Luna *et al.*, 2010a), lo cual promovería su localización en balsas lipídicas (Bravo *et al.*, 2004; Zhuang *et al.*, 2002), y facilitaría su posterior inserción en la membrana, con la consecuente formación de poros (Bravo *et al.*, 2007).

Otro aspecto interesante a considerar es el hecho de que la  $\alpha$ -amilasa presente en la fracción de proteínas ancladas por GPI constituye el elemento más abundante de las proteínas localizadas en las vesículas del borde apical de la membrana (Fernández-Luna *et al.*, 2010a). Es posible que la alta concentración a la cual se encuentra la  $\alpha$ -amilasa la convierta en un excelente blanco de las toxinas Cry, explicando en parte la eficiencia de las mismas para matar a las larvas de *An. albimanus*. Llama la atención que una  $\alpha$ -amilasa fue



identificada como el receptor de la toxina binaria de *B. sphaericus* en los mosquitos *C. quinquefasciatus* y *An. gambiae* (Silva-Filha *et al.*, 1999; Romao *et al.*, 2006; Opota *et al.*, 2008). Basados en los resultados anteriormente descritos y con la finalidad de comprobar su participación como receptor de las toxinas Cry, proponemos llevar a cabo la interferencia de la expresión de la  $\alpha$ -amilasa en el mosquito *Anopheles albimanus*, esperando obtener un mosquito resistente a estas toxinas.

Como se mencionó anteriormente, la selectividad de la toxina también está determinada por los dominios específicos a través de los cuales estas toxinas interactúan con los receptores presentes en el intestino del insecto blanco. La interacción de las toxinas Cry y sus correspondientes receptores tiene lugar a través de las asas del dominio II (Rajamohan *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2001). Se ha demostrado que la unión de las toxinas Cry1A a su receptor Caderina en insectos lepidópteros es un evento complejo que involucra a las tres asas expuestas del dominio II (Rajamohan *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2001). De manera similar, los epitopes de unión de las toxinas Cry mosquitocidas con el receptor Caderina en *Ae. aegypti* involucra el asa  $\alpha$ -8 del dominio II de la toxina Cry11Aa (Chen *et al.*, 2009a). En el caso de la APN de lepidópteros, no sólo las asas del dominio II de Cry1Ab o Cry1Ac están involucradas en su unión, sino que también algunas regiones expuestas del dominio III son importantes en la interacción de las toxinas Cry1A con la APN (Jenkins *et al.*, 2000). Se propuso un mecanismo secuencial de unión para la interacción de Cry1Ac con la APN, en donde el dominio III de Cry1Ac participa en la unión inicial a la APN, lo que favorece la posterior unión de las asas expuestas del dominio II con un sitio diferente de la APN (Jenkins *et al.*, 2000). De forma análoga, en el caso del receptor FA del mosquito *Ae. aegypti*, éste se une a Cry11Aa a través del asa  $\alpha$ -8 del dominio II y de los residuos <sup>561</sup>RVQSQNSGNN<sup>570</sup> del dominio III (Fernández *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2009). Con estos antecedentes, proponemos realizar un análisis de la participación de las asas del dominio II y de las regiones expuestas del dominio III de Cry4Ba y Cry11Aa en la unión a la  $\alpha$ -amilasa y en la toxicidad en contra de *An. albimanus*.

El dominio II de las toxinas Cry es importante en la especificidad que estas proteínas muestran hacia sus blancos. Diferentes estudios que abordan la participación de

las asas en la especificidad han sugerido que el requerimiento de las asas podría variar para las diferentes toxinas Cry en las distintas especies de insectos blanco (Abdullah *et al.*, 2003; Abdullah y Dean, 2004; Liu y Dean, 2006). El dominio II consiste de tres láminas  $\beta$  antiparalelas empaquetadas alrededor de un núcleo hidrofóbico en forma de un “ $\beta$ -prisma” (Pigott y Ellar, 2007). Su estructura es la más variable de los tres dominios, particularmente sus asas apicales, donde tres de ellas han sido implicadas en la unión al receptor, las cuales difieren considerablemente tanto en longitud como en conformación entre las diferentes toxinas Cry (Pigott y Ellar, 2007). Se ha propuesto que el dominio II de las toxinas Cry es similar al dominio variable de los anticuerpos (Boonserm *et al.*, 2005). El dominio variable de los anticuerpos es una estructura globular compacta compuesta de dos láminas  $\beta$  antiparalelas (Mian *et al.*, 1991). En ambos casos, las asas apicales participan en la interacción anticuerpo/antígeno o en la interacción receptor/toxina y presentan una alta variación tanto en longitud, como en secuencia y conformación (Boonserm *et al.*, 2005). La capacidad de los anticuerpos de reconocer y unirse a una gran diversidad de antígenos deriva de sus características estructurales, que los habilitan para modular su estructura con la finalidad de optimizar su ajuste al antígeno, así como por la composición química en sus sitios de unión (Mian *et al.*, 1991). Los anticuerpos presentan un alto contenido de aminoácidos aromáticos en éstos, tal vez para minimizar la pérdida de entropía al unirse al antígeno, lo cual resulta en menos grados de libertad disponibles para adquirir un ajuste geométrico preciso con el antígeno (Lawrence y Colman, 1993). Se ha propuesto que la similitud observada entre las interacciones anticuerpo/antígeno y receptor/toxina constituye la base para explicar como es posible que una misma toxina Cry sea capaz de reconocer a diferentes receptores (Boonserm *et al.*, 2005).

Profundizando en este aspecto, se ha analizado si la sustitución de las asas del dominio II podría dar lugar a toxinas con nuevas especificidades, para lo cual se han utilizado secuencias derivadas a partir de regiones determinantes-complementarios de anticuerpos (CDR) que reemplazan las asas apicales del dominio II de la Cry1Aa (Pigott *et al.*, 2008). Un análisis de variantes de la sustitución de cada asa apical con secuencias individuales de CDRs indicó que la estructura de Cry1Aa es capaz de tolerar una gran diversidad en secuencia en todas las posiciones de las asas (Pigott *et al.*, 2008). Estas

substituciones también han mostrado que la posición de las asas es un determinante importante en la toxicidad, encontrándose que el asa 2 es esencial para la actividad, mientras que el efecto de la sustitución en el asa 1 y el asa 3 son dependientes de secuencia (Abdullah *et al.*, 2003). Estos datos subrayan la enorme plasticidad estructural presente en los epítopes de las toxinas Cry que éstas explotan para reconocer una gran diversidad de receptores.

El estudio de la participación de las asas del dominio II en la especificidad también ha sido abordado mediante el análisis de intercambio de asas de las toxinas (Abdullah *et al.*, 2003). Así, por ejemplo, mediante la remodelación de las asas del dominio II de Cry4Ba para asemejarlas a las de la toxina Cry4Aa, se logró incrementar su toxicidad contra *C. quinquefasciatus* y *C. pipiens* en más de 285 y 700 veces, respectivamente (Abdullah *et al.*, 2003), partiendo de la base de que la toxina Cry4Aa, a diferencia de Cry4Ba, es tóxica contra los mosquitos *C. quinquefasciatus* y *C. pipiens* (Abdullah *et al.*, 2003). En un estudio similar, la Cry19Aa, una toxina mosquitocida con especificidad contra *An. stephensi* y *C. pipiens*, pero que no presenta actividad contra *Ae. aegypti*, incrementó en más de 42,000 veces su toxicidad contra este mosquito mediante la ingeniería de las asas 1 y 2 del dominio II para asemejarlas a aquellas de Cry4Ba (Abdullah y Dean, 2004). Por otro lado, es posible introducir actividad mosquitocida a Cry1Aa, la cual naturalmente es tóxica contra lepidópteros, mediante modificaciones de la secuencia de las asas 1 y 2 asemejándolas a la secuencia de estas regiones presentes en la Cry4Ba (Liu y Dean, 2006). Estos datos contribuyen de manera fundamental a aumentar nuestra comprensión de las bases moleculares de la interacción entre la toxina y su receptor.

La identificación de una  $\alpha$ -amilasa como receptor de las toxinas Cry amplía el universo de receptores involucrados en la toxicidad de estas proteínas y abre el paso para el entendimiento cabal de los determinantes de especificidad en la unión a sus receptores y en la formación del poro. Estos estudios pueden servir de base para el diseño de estrategias de control más eficaces en contra de la malaria y otras enfermedades transmitidas por mosquitos. Además, entender los principios de interacción entre las toxinas Cry y sus receptores permitirá el desarrollo de toxinas con nuevas especificidades. En conjunto, el

conocimiento surgido del estudio del sinergismo mostrado por los componentes del cristal de *Bti* en *An. albimanus* podrá ser utilizado en el desarrollo de nuevas estrategias diseñadas para evitar y/o combatir el fenómeno de resistencia de una manera eficaz.

## 12.- REFERENCIAS

- Abdullah, MA, Alzate, O, Mohammad, M, McNall, RJ, Adang, MJ, *et al.* 2003. Introduction of *Culex* toxicity into *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba by protein engineering. *Appl Environ Microbiol.* 69:5343–5353.
- Abdullah, MA, Dean, DH. 2004. Enhancement of Cry19Aa mosquitocidal activity against *Aedes aegypti* by mutations in the putative loop regions of domain II. *Appl Environ Microbiol.* 70:3769–3771.
- Abdullah, MA, Valaitis, AP, Dean, DH. 2006. Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochem.* 7:16.
- Aly, AS, Vaughan, AM, Kappe, SH. 2009. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annu Rev Microbiol.* 63:195-221.
- Angst, BD, Marcozzi, C, Magee, AI. 2001. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci.* 114: 629-641.
- Angsuthanasombat, C, Crickmore, N, Ellar, DJ. 1992. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism in vivo. *FEMS Microbiol Letts.* 73:63-68.
- Aroian, R, van der Goot, FG. 2007. Pore-forming toxins and cellular non-immune defenses (CNIDs). *Curr Opin Microbiol.* 10:57-61.
- Aronson, AI, Shai, Y. 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol Letts.* 195:1-8.
- Bejarano, E. E. 2003. Occurrence of the malaria vector *Anopheles albimanus* Wiedemman (Diptera: Culicidae) in Isla Fuerte, Colombia. *Neotrop Entomol.* 32: 517-518.
- Ben-Dov, E, Boussiba, S, Zaritsky, A. 1995. Mosquito larvicidal activity of *Escherichia coli* with combinations of genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J Bacteriol.* 177:2851-2857.
- Berry, C, O'Neil, S, Ben-Dov, E, Jones, AF, Murphy, L, *et al.* 2002. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl Environ Microbiol.* 68:5082-5095.
- Bischof, LJ, Kao, CY, Los, FCO, Gonzalez, MR, Shen, Z, *et al.* 2008. Activation of the unfolded protein response is required for defenses against bacterial pore-forming toxin in vivo. *PLoS Pathogens.* 4:1-11.

- Boonserm, P, Davis, P, Ellar, DJ, Li, J. 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J Mol Biol.* 348:363–382.
- Bozdech, Z, Mok, S, Hu, G, Imwong, M, Jaidee, A, *et al.* 2008. The transcriptome of *Plasmodium vivax* reveals divergence and diversity of transcriptional regulation in malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105: 16290–16295.
- Bravo, A, Gómez, I, Conde, J, Muñoz-Garay, C, Sánchez, 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. *Biochim Biophys Acta.* 1667:38–46.
- Bravo, A, Gill, SS, Soberón, M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon.* 49:423–435.
- Breman, JG, Alilio, MS, White, NJ. 2007. Defining and Defeating the Intolerable Burden of Malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 77(Suppl 6), pp. vi–xi
- Butko, P. 2003. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl Environ Microbiol.* 69: 2415–2422 .
- Chen, J, Aimanova, KG, Fernandez, LE, Bravo, A, Soberon, M, *et al.* 2009a. *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biochem J.* 424:191-200.
- Chen, J, Aimanova, KG, Pan, S, Gill, SS. 2009b. Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. *Insect Biochem Mol Biol.* 39:688-696.
- Cohen, S, Dym, O, Albeck, S, Ben-Dov, E, Cahan, R, *et al.* 2008. High-resolution crystal structure of activated Cyt2Ba monomer from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J Mol Biol.* 380:820–827.
- Crickmore, N, Bone, EJ, Williams, JA, Ellar, DJ. 1995. Contribution of the individual components of the  $\delta$ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiol Letts.* 131:249–254.
- Crickmore, N, Zeigler, DR, Feitelson, J, Schnepf, E, Van Rie, J, *et al.* 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:807–813.
- Delecluse, A, Poncet, S, Klier, A, Rapoport, G. 1993. Expression of cryIVA and cryIVB genes, independently or in combination, in a crystal-negative strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl Environ Microbiol.* 59:3922–3927.

- de Maagd, RA, Bravo, A, Crickmore, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*. 17:193-199.
- de Maagd, RA, Bravo, A, Berry, C, Crickmore, N, Schnepf, HE. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu Rev Genet*. 37:409-433.
- Dorsch, JA, Candas, M, Griko, N, Maaty, W, Midboe, E, *et al.* 2002. Cry1A toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a region adjacent to the membrane-proximal extracellular domain of BT-R1 in *Manduca sexta*: involvement of a cadherin in the entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem Mol Biol*. 32:1025-1036.
- Dzul, FA, Penilla, RP, Rodríguez, AD. 2007. Susceptibilidad y mecanismos de resistencia a insecticidas en *Anopheles albimanus* del sur de la Península de Yucatán, México. *Salud Pública Mex*. 49:302-311.
- Eastman, RT, Fidock, DA. 2009. Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nat Rev Microbiol*. 7:864-874.
- Eguchi, M. 1995. Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 111:151-162.
- Escalante, AA, Ayala, FJ. 1994. Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:11373-11377.
- Federici, BA, Park, HW, Bideshi, DK, Wirth, MC, Johnson, JJ. 2003. Recombinant bacteria for mosquito control. *J Exp Biol*. 206:3877-3885.
- Fernández, LE, Pérez, C, Segovia L, Rodríguez MH, Gill, SS, *et al.* 2005. Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop  $\alpha$ -8 of domain II. *FEBS Letts*. 579:3508-3514.
- Fernández, LE, Aimanova, KG, Gill, SS, Bravo, A, Soberón, M. 2006. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem J*. 394:77-84.
- Fernández, LE, Martínez-Anaya, C, Lira, E, Chen, J, Evans, A, *et al.* 2009. Cloning and epitope mapping of Cry11Aa-binding sites in the Cry11Aa-receptor alkaline phosphatase from *Aedes aegypti*. *Biochemistry*. 48:8899-8907.
- Fernández-Luna, MT, Lanz-Mendoza, H, Gill SS, Bravo, A, Soberon, M, *et al.* 2010a. An alpha-amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Environ Microbiol*. 12: 746-757.



Fernández-Luna, MT, Tabashnik, BE, Lanz-Mendoza, H, Bravo, A, Soberón, M, *et al.* 2010b. Single-Concentration Tests Show Synergism Among *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* Toxins Against the Malaria Vector Mosquito *Anopheles albimanus*. *J Invertebr Pathol.* Article in Press. doi:10.1016/j.jip.2010.03.007

Fillinger, U, Kannady, K, William, G, Vanek, MJ, Dongus, S, *et al.* 2008. A tool box for operational mosquito larval control: preliminary results and early lessons from the urban malaria control programme in Dar es Salaam, Tanzania. *Malar J.* 7:20.

Gahan, LJ, Gould, F, Heckel, DG. 2001. Identification of a gene associated with *Bt* resistance in *Heliothis virescens*. *Science.* 293:857–860.

Gardner, MJ, Hall, N, Fung, E, White, O, Berriman, M, *et al.* 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 419:498-511.

Geissbühler, Y, Kannady, K, Chaki, PP, Emidi, B, Govella, NJ, *et al.* 2009. Microbial larvicide application by a large-scale, community based program reduces malaria infection prevalence in urban Dar es Salaam, Tanzania. *PLoS One.* 4(3):e5107.

Gill, M, Ellar, DJ. 2002. Transgenic *Drosophila* reveals a functional *in vivo* receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. *Insect Mol Biol.* 11: 619–625.

Gill, SS, Cowles, EA, Francis, V. 1995. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAC toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *J Biol Chem.* 270: 27277–27282.

Gómez, I, Miranda-Rios, J, Rudiño-Piñera, E, Oltean, DI, Gill, SS, *et al.* 2002a. Hydrophobic complementarity determines interaction of epitope 869HITDTNNK876 in *Manduca sexta* Bt-R1 receptor with loop 2 of domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *J Biol Chem.* 277:30137-30143.

Gómez, I, Sánchez, J, Miranda, R, Bravo, A, Soberón, M. 2002b. 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 Letts.* 513:242–246.

González, MR, Bischofberger, M, Pernot, L, van der Goot, FG, Frêche, B. 2008. Bacterial pore-forming toxins: the (w)hole story? *Cell Mol Life Sci.* 65:493-507.

Griffitts, JS, Whitacre, JL, Stevens, DE, Aroian, RV. 2001. Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. *Science.* 293:860-864.

Griffitts, JS, Huffman, DL, Whitacre, JL, Barrows, BD, Marroquin, LD, *et al.* 2003. Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin host interactions. *J Biol Chem.* 278:45594–45602.

- Griffitts, JS, Haslam, SM, Yang, T, Garczynski, SF, Mulloy, B, *et al.* 2005. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science*. 307:922-925.
- Guerchicoff, A, Delécluse, A, Rubinstein, CP. 2001. The *Bacillus thuringiensis* Cyt genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. *Appl Environ Microbiol*. 67:1090-1096.
- Hall, N, Karras, M, Raine, JD, Carlton, JM, Kooij, TW, *et al.* 2005. A comprehensive survey of the Plasmodium life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science*. 7:82-86.
- Hernández-Soto, A, Del Rincón-Castro, MC, Espinoza, AM, Ibarra, JE. 2009. Parasporal body formation via overexpression of the Cry10Aa toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, and Cry10Aa-Cyt1Aa synergism. *Appl Environ Microbiol*. 75:4661-4667.
- Herrero, S, Gechev, T, Bakker, PL, Moar, WJ, de Maagd, RA. 2005. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. *BMC Genomics*. 6:96.
- Holt, RA, Subramanian, GM, Halpern, A, Sutton, GG, Charlab, R, *et al.* 2002. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*. 298:129-149.
- Hua, G, Jurat-Fuentes, JL, Adang, MJ. 2004. Bt-R1a extracellular cadherin repeat 12 mediates *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab binding and cytotoxicity. *J Biol Chem*. 279:28051-28056.
- Hua, G, Zhang, R, Abdullah, MA, Adang, MJ. 2008. *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. *Biochemistry*. 47:5101-5110.
- Hua, G, Zhang, R, Bayyareddy, K, Adang, MJ. 2009. *Anopheles gambiae* alkaline phosphatase is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis jegathesan* Cry11Ba toxin. *Biochemistry*. 48:9785-9793.
- Huffman, DL, Abrami, L, Sasik, R, Corbeil, J, van der Goot, FG, *et al.* 2004. Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:10995-11000.
- Iacovache, I, van der Goot, FG, Pernot, L. 2008. Pore formation: an ancient yet complex form of attack. *Biochim Biophys Acta*. 1778:1611-1623.
- Ibarra, JE, del Rincón, MC, Ordúz, S, Noriega, D, Benintende, G, *et al.* 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Appl Environ Microbiol*. 69:5269-5274.

- Ito, J, Ghosh, A, Moreira, LA, Wimmer, EA, Jacobs-Lorena, M. 2002. Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature*. 417:452-455.
- Jenkins, JL, Lee, MK, Valaitis, AP, Curtiss, A, Dean, DH. 2000. Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth Aminopeptidase N receptor. *J Biol Chem*. 275:14423-14431.
- Juárez-Pérez, V, Guerchicoff, A, Rubinstein, C, Delécluse, A. 2002. Characterization of Cyt2Bc Toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*. *Appl Environ Microbiol*. 68:1228–1231.
- Jurat-Fuentes, JL, Adang, MJ. 2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur J Biochem*. 271:3127-3135.
- Knight, PJ, Crickmore, N, Ellar, DJ. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA (c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol Microbiol*. 11:429–436.
- Knowles, BH, Blatt, MR, Tester, M, Horsnell, JM, Carroll, J, *et al*. 1989. A cytolytic  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *FEBS Letts*. 244:259-262.
- Konit, PA, Ellar, DJ. 1994. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic  $\delta$ -endotoxins. *Microbiology*. 140:1869-1880.
- Lawrence, MC, Colman, PM. 1993. Shape Complementarity at Protein/Protein Interfaces. *J Mol Biol*. 234, 946-950.
- Lee, MK, Jenkins, JL, You, TH, Curtiss, A, Son, JJ, *et al*. 2001. Mutations at the arginine residues in  $\alpha 8$  loop of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac affect toxicity and binding to *Manduca sexta* and *Lymantria dispar* aminopeptidase N. *FEBS Letts*. 497:108-112.
- Li, J, Koni, PA, Ellar, DJ. 1996. Structure of the mosquitocidal  $\delta$ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J Mol Biol*. 257:129-152.
- Likitvivatanavong, S, Aimanova, KG, Gill, SS. 2009. Loop residues of the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin are important for mosquitocidal activity. *FEBS Letts*. 583, 2021–2030.
- Liu, XS, Dean, DH. 2006. Redesigning *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin into a mosquito toxin. *Protein Eng Des Sel*. 19:107–111.

- Lobo, CA, Kumar, N. 1998. Sexual differentiation and development in the malaria parasite. *Parasitology Today*. 14:146-150.
- Manceva, SD, Pusztai-Carey, M, Russo, PS, Butko, P. 2005. A detergent-like mechanism of action of the cytolytic toxin Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Biochemistry*. 44:589-597.
- Masson, L, Lu, YJ, Mazza, A, Brousseau, R, Adang, MJ. 1995. The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. *J Biol Chem*. 270:20309-20315.
- Mian, IS, Bradwell, AR, Olson, AJ. 1991. Structure, Function and Properties of Antibody Binding Sites. *J Mol Biol*. 217, 133-151.
- Michalakis, Y, Renaud, F. 2009. Evolution of vector control. *Nature*. 462:298-300.
- Mittal, PK. 2003. Biolarvicides in vector control : challenges and prospects. *J Vect Borne Dis*. 40:20-32.
- Mueller, I, Galinski, MR, Baird, JK, Carlton, JM, Kochar, DK, *et al*. 2009. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis*. 9:555-566.
- Nielsen-LeRoux, C, Charles, J-F, Thiery, I, Georghiou, GP. 1995. Resistance in a laboratory population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae) to *Bacillus sphaericus* binary toxin is due to a change in the receptor on midgut brush-border membranes. *Eur J Biochem FEBS*. 228:206-210.
- Opota, O, Charles, JF, Tarot, S, Pauron, D, Darboux, I. 2008. Identification and characterization of the receptor from the *Bacillus sphaericus* binary toxin in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 149:419-427.
- Parker, MW, Feil, SC. 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol*. 88:91-142.
- Pérez, C, Fernández, LE, Sun, J, Folch, JL, Gill, SS, *et al*. 2005. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:18303-18308.
- Pérez, C, Muñoz-Garay, C, Portugal, LC, Sánchez, J, Gill, SS, *et al*. 2007. *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. *Cell Microbiol*. 9:2931-2937.
- Pigott, CR, Ellar, DJ. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev*. 71:255-281.

- Pigott, CR, King, MS, Ellar, DJ. 2008. Investigating the Properties of *Bacillus thuringiensis* Cry Proteins with Novel Loop Replacements Created Using Combinatorial Molecular Biology. *App Env Microbiol.* 3497–3511.
- Poncet, S, Delecluse, A, Klier, A, Rapoport, G. 1995. Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB and CryIVD toxic components of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *J Invertebr Pathol.* 66: 131–135.
- Promdonkoy, B, Ellar, DJ. 2000. Membrane pore architecture of a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem J.* 350:275-282.
- Promdonkoy, B, Ellar, DJ. 2005. Structure-function relationships of a membrane pore forming toxin revealed by reversion mutagenesis. *Mol Membrane Biol.* 22:327-337.
- Rajagopal, R, Sivakumar, S, Agrawal, N, Malhotra, P, Bhatnagar, RK. 2002. Silencing of midgut Aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J Biol Chem.* 277:46849-46851.
- Rajamohan, F, Alcantara, E, Lee, MK, Chen, XJ, Curtiss, A, *et al.* 1995. Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryIAb d-endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. *J Bacteriol.* 177:2276-2282.
- Rausell, C, Muñoz-Garay, C, Miranda-Casso, LR, Gómez, I, Rudiño-Piñera, E, *et al.* 2004. Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of CryIAb toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. *Biochemistry.* 43:166–174.
- Regis, L, da Silva, SB, Melo-Santos, MA. 2000. The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 95 Suppl 1:207-210.
- Rodriguez, MH, Gonzalez-Ceron, L, Hernandez, JE, Nettel, JA, Villarreal, C, *et al.* 2000. Different prevalences of Plasmodium vivax phenotypes VK210 and VK247 associated with the distribution of Anopheles albimanus and Anopheles pseudopunctipennis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 62:122-127.
- Romao, TP, De Melo Chalegre, KD, Key, S, Junqueira Ayres, CF, Fontes de Oliveira, CM, *et al.* 2006. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its  $\alpha$ -glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. *FEBS J.* 273:1556–1568.
- Sangadala, S, Walters, FS, English, LH, Adang, MJ. 1994. A mixture of *Manduca sexta* Aminopeptidase and Phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA toxin binding and  $^{86}\text{Rb}^+$ - $\text{K}^+$  efflux *in vitro*. *J Biol Chem.* 269:10088-10092.

- Schnepf, E, Crickmore, N, Van Rie, J, Lereclus, D, Baum, J, *et al.* 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:775–806.
- Silva-Filha, MH, Nielsen-LeRoux, C, Charles, J-F. 1999. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Insect Biochem Mol Biol.* 29:711–721.
- Soberón, M, Fernández, LE, Pérez, C, Gill, SS, Bravo, A. 2007. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon.* 49:597–600.
- Soberón, M, Gill, SS, Bravo, A. 2009. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cell Mol Life Sci.* 66:1337-1349.
- Song, L, Hobaugh, MR, Shustak, C, Cheley, S, Bayley, H, *et al.* 1996. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science.* 274:1859-1866.
- Tabashnik, BE. 1992. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl Environ Microbiol.* 58:3343-3346.
- Thomas, WE, Ellar, DJ. 1983. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* insecticidal *d*-endotoxin. *FEBS Letts.* 154:362-368.
- Todryk, SM, Adrian, VS, Hill, AVS. 2007. VACCINE WATCH: Malaria vaccines: the stage we are at. *Nat Rev Microbiol.* 5:487-489.
- Vadlamudi, RK, Ji, TH, Bulla, JrLA. 1993. A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *bedineri*. *J Biol Chem.* 268:12334-12340.
- Vadlamudi, RK, Weber, E, Ji, I, Ji, TH, Bulla, JrLA. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J Biol Chem.* 270:5490-5494.
- Valeva, A, Hellmann, N, Walev, I, Strand, D, Plate, M, *et al.* 2006. Evidence that clustered phosphocholine head groups serve as sites for binding and assembly of an oligomeric protein pore. *J Biol Chem.* 281:26014-26021.
- van Meer, G, Voelker, DR, Feigenson, GW. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:112-124.
- WHO. 1996. Chapter 1: The state of world health. *Insectborne diseases.* In *The World Health Report 1996 – Fighting Disease, Fostering Development.* Geneva, Switzerland: WHO, pp. 46–56.
- Wiener, M, Freymann, D, Ghosh, P, Stroud, RM. 1997. Crystal structure of colicin Ia. *Nature.* 385:461-464.

Wirth, MC, Georghiou, GP, Federici, BA. 1997. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:10536–10540.

Wirth, MC, Walton, WE, Federici, BA. 2002. Evaluation of resistance management strategies for *Bacillus sphaericus*. Mosquito control research. Annual report. *University of California Division of Agriculture and Natural Resources*. pp. 17-18.

Wirth, MC, Park, HW, Walton, WE, Federici, BA. 2005. Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Appl Environ Microbiol*. 71:185–189.

Wu, D, Chang, FN. 1985. Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal. *FEBS Letts*. 190:232-236.

Yadouleton, AW, Padonou, G, Asidi, A, Moiroux, N, Bio-Banganna, S, *et al.* 2010. Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* in southern Benin. *Malar J*. 9:83.

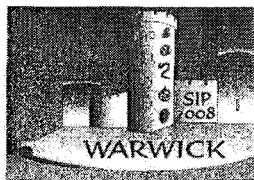
Zhang, X, Candas, M, Griko, NB, Taussig, R, Bulla, JrLA. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:9897–9902.

Zhuang, M, Oltean, DI, Gómez, I, Pullikuth, AK, Soberón, M, *et al.* 2002. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J Biol Chem*. 277:13863–13872.

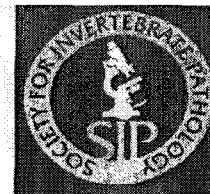
**Anexos**



## **Premios Internacionales**



SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY



**Outstanding Student Oral Presentation  
Third Place Award**

***Maria Teresa Fernandez-Luna***

*Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México*

A handwritten signature in cursive script, likely belonging to Andrcas Linde.

Andrcas Linde, Chair, Student Awards Committee

A handwritten signature in cursive script, likely belonging to Mark Goettel.

Mark Goettel, President, SIP

41<sup>st</sup> Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology

**OTRAS COLABORACIONES**

**Riboswitch folding  
One at a time and step by step**

**Fernández-Luna MT, and Miranda-Ríos J.**

*RNA Biology 5(1): 1 - 4, 2008*

## RESUMEN

Los riboswitches, al igual que otras moléculas de RNA, deben doblarse en estructuras tridimensionales complejas, para llevar a cabo sus diferentes funciones. Los estudios de moléculas únicas (*single-molecule* en inglés), permiten determinar los estados conformacionales intermedios, así como la dinámica involucrada para alcanzar las diferentes conformaciones. A pesar de que el FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) y el FMOT (*force-measuring optical tweezers*) son métodos muy poderosos, ambas técnicas se podrían combinar para la identificación directa de los elementos estructurales de una molécula de RNA conforme ésta se va doblando. En este trabajo hacemos una compilación de los trabajos más recientes realizados para determinar como es que el riboswitch que une adenina se estructura en presencia y ausencia de su ligando.

## Point of View

# Riboswitch folding

## One at a time and step by step

María Teresa Fernández-Luna and Juan Miranda-Ríos\*

Departamento de Microbiología Molecular; Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional Autónoma de México; Cuernavaca, Morelos México

Abbreviations: pN, picoNewton; nt, nucleotide

Key words: RNA folding, riboswitches, adenine, FRET, optical tweezers

Riboswitches are mRNAs that regulate gene expression upon specific binding of a small metabolite (vitamin cofactors, nucleobases, amino acids, carbohydrates or even metal ions). Riboswitches must fold into very intricate 3D structures to accomplish their function. Single-molecule studies are very powerful techniques that allow the characterization and elucidation of complex folding paths as well as the identification of intermediate conformational states that an RNA must traverse to acquire its native, functional structure. We review some recent reports on the folding of the adenine-binding riboswitch as studied by fluorescence resonance energy transfer (FRET) and force-measuring optical tweezers (FMOT) techniques.

### Introduction

Riboswitches are mRNA molecules able to interact with metabolites like cofactors (thiamin pyrophosphate,<sup>1</sup> flavin mononucleotide,<sup>2</sup> adenosyl cobalamin<sup>3</sup> or S-adenosyl methionine<sup>4</sup>), nucleobases (adenine,<sup>5</sup> guanine<sup>6</sup>), amino acids (glycine,<sup>7</sup> lysine<sup>8</sup>), amino sugars (glucosamine-6 phosphate<sup>9</sup>), and metal ions (Mg<sup>2+</sup>).<sup>10</sup> Binding of the effector molecule in the aptamer domain causes a conformational change in the so-called expression platform that affects the expression of the downstream genes at the levels of premature transcription termination or translation initiation in prokaryotes (reviewed in ref. 11).

Fundamental studies have been carried out on different features of riboswitch function such as the molecular and structural basis of ligand specificity, the rates of ligand binding and folding into the very intricate 3D structures needed to accomplish their function. One of the most thoroughly studied riboswitches is the adenine-binding riboswitch. This riboswitch and the closely related guanine-binding riboswitch are formed by a three-helix junction as depicted in Figure 1.<sup>5,6,12,13</sup> The specificity shown by the purine riboswitches is dependent on a Watson-Crick base pair interaction between the ligand and a pyrimidine residue, leading to a 20,000-fold difference in affinity between adenine and guanine.<sup>6,12</sup> Adenine is completely buried

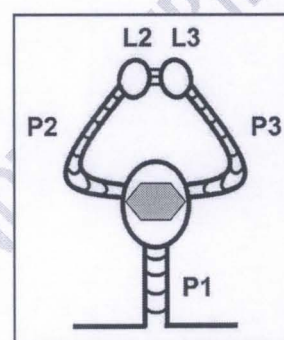


Figure 1. Secondary structure cartoon of the adenine-binding riboswitch showing its structural elements. Adenine is depicted as an orange hexagon.

into the binding pocket in such a way that 97.8% of the ligand is rendered solvent inaccessible.<sup>13</sup> An important feature shown by the crystal structure of the adenine-binding riboswitch is the formation of a loop-loop interaction that brings together helices P2 and P3 (Fig. 1).<sup>13</sup> Although the 3D structure explains how adenine is recognized in a highly specific way by the adenine-binding riboswitch, it tells us very little about how it folds into its tuning-fork structure.

### Biophysical Methods to Study Riboswitch Folding

Newly developed biophysical techniques have allowed the study of molecular motions at nearly atomic resolution, facilitating the characterization of enzymatic activities like the ones displayed by RNA and DNA Polymerases<sup>14,15</sup> or the activities of the motor proteins (e.g., myosin, kinesin, dynein).<sup>16-18</sup> Such techniques have also proven very useful for the study of conformational changes induced by folding in macromolecules like RNA and DNA.<sup>19,20</sup>

Single-molecule approaches have several advantages.<sup>21</sup> The most important is that these techniques allow the detection and manipulation of individual molecules, so one can control the initial state and see all the transition intermediate states that the molecule undergoes to attain a final state. This allows to measure individual fluctuations in thermodynamic and kinetic parameters, thus eliminating the averaging inherent in bulk, biochemical studies. In particular for RNA, single-molecule studies make the detection and characterization of the intermediate states that an RNA molecule shows in a folding

\*Correspondence to: Juan Miranda-Ríos; Departamento de Microbiología Molecular; Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional Autónoma de México; Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250 México; Email: juanm@ibt.unam.mx

Submitted: 03/25/08; Accepted: 03/26/08

Previously published online as an RNA Biology E-publication:

<http://www.landesbioscience.com/journals/rnabiology/article/5974>



## Point of View

# Riboswitch folding

One at a time and step by step

María Teresa Fernández-Luna and Juan Miranda-Ríos\*

Departamento de Microbiología Molecular; Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional Autónoma de México; Cuernavaca, Morelos México

**Abbreviations:** pN, piconewton; nt, nucleotide

**Key words:** RNA folding, riboswitches, adenine, FRET, optical tweezers

Riboswitches are mRNAs that regulate gene expression upon specific binding of a small metabolite (vitamin cofactors, nucleobases, amino acids, carbohydrates or even metal ions). Riboswitches must fold into very intricate 3D structures to accomplish their function. Single-molecule studies are very powerful techniques that allow the characterization and elucidation of complex folding paths as well as the identification of intermediate conformational states that an RNA must traverse to acquire its native, functional structure. We review some recent reports on the folding of the adenine-binding riboswitch as studied by fluorescence resonance energy transfer (FRET) and force-measuring optical tweezers (FMOT) techniques.

## Introduction

Riboswitches are mRNA molecules able to interact with metabolites like cofactors (thiamin pyrophosphate,<sup>1</sup> flavin mononucleotide,<sup>2</sup> adenosyl cobalamin<sup>3</sup> or S-adenosyl methionine<sup>4</sup>), nucleobases (adenine,<sup>5</sup> guanine<sup>6</sup>), amino acids (glycine,<sup>7</sup> lysine<sup>8</sup>), amino sugars (glucosamine-6 phosphate<sup>9</sup>), and metal ions (Mg<sup>2+</sup>).<sup>10</sup> Binding of the effector molecule in the aptamer domain causes a conformational change in the so-called expression platform that affects the expression of the downstream genes at the levels of premature transcription termination or translation initiation in prokaryotes (reviewed in ref. 11).

Fundamental studies have been carried out on different features of riboswitch function such as the molecular and structural basis of ligand specificity, the rates of ligand binding and folding into the very intricate 3D structures needed to accomplish their function. One of the most thoroughly studied riboswitches is the adenine-binding riboswitch. This riboswitch and the closely related guanine-binding riboswitch are formed by a three-helix junction as depicted in Figure 1.<sup>5,6,12,13</sup> The specificity shown by the purine riboswitches is dependent on a Watson-Crick base pair interaction between the ligand and a pyrimidine residue, leading to a 20,000-fold difference in affinity between adenine and guanine.<sup>6,12</sup> Adenine is completely buried

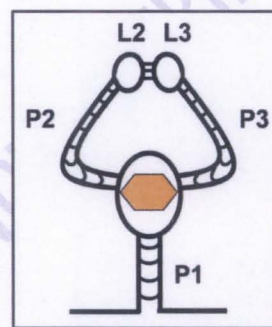


Figure 1. Secondary structure cartoon of the adenine-binding riboswitch showing its structural elements. Adenine is depicted as an orange hexagon.

into the binding pocket in such a way that 97.8% of the ligand is rendered solvent inaccessible.<sup>13</sup> An important feature shown by the crystal structure of the adenine-binding riboswitch is the formation of a loop-loop interaction that brings together helices P2 and P3 (Fig. 1).<sup>13</sup> Although the 3D structure explains how adenine is recognized in a highly specific way by the adenine-binding riboswitch, it tells us very little about how it folds into its tuning-fork structure.

## Biophysical Methods to Study Riboswitch Folding

Newly developed biophysical techniques have allowed the study of molecular motions at nearly atomic resolution, facilitating the characterization of enzymatic activities like the ones displayed by RNA and DNA Polymerases<sup>14,15</sup> or the activities of the motor proteins (e.g., myosin, kinesin, dynein).<sup>16-18</sup> Such techniques have also proven very useful for the study of conformational changes induced by folding in macromolecules like RNA and DNA.<sup>19,20</sup>

Single-molecule approaches have several advantages.<sup>21</sup> The most important is that these techniques allow the detection and manipulation of individual molecules, so one can control the initial state and see all the transition intermediate states that the molecule undergoes to attain a final state. This allows to measure individual fluctuations in thermodynamic and kinetic parameters, thus eliminating the averaging inherent in bulk, biochemical studies. In particular for RNA, single-molecule studies make the detection and characterization of the intermediate states that an RNA molecule shows in a folding

\*Correspondence to: Juan Miranda-Ríos; Departamento de Microbiología Molecular; Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional Autónoma de México; Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250 México; Email: juanm@ibt.unam.mx

Submitted: 03/25/08; Accepted: 03/26/08

Previously published online as an RNA Biology E-publication:  
<http://www.landesbioscience.com/journals/rnabiology/article/5974>



pathway more accessible. And, finally, they are very well suited for the study of the mechanical forces implied in the folding or unfolding of RNA.<sup>22</sup>

Next, we will discuss the results obtained by the use of fluorescence resonance energy transfer (FRET) and force-measuring optical tweezers (FMOT) as applied to the study of folding of the adenine-binding riboswitch.

### Importance of the Tertiary Interaction Between the Loops of the Adenine Riboswitch as Shown by FRET

FRET is well suited for the measurement of motions in the nanometer range via the resonant coupling of two different fluorophores attached to the molecule of interest.<sup>23</sup> The donor molecule is excited by an external illumination source and transfers energy to a nearby acceptor molecule whose absorption spectrum overlaps the emission spectrum of the donor. The movement of the labeled portions of the molecule with respect to one another produced by conformational changes affects the efficiency of FRET and allows displacements in the range of 1–10 nm to be observed.<sup>24</sup>

It has been shown that the formation of a tertiary interaction between the terminal loops L2 and L3 of the adenine-binding riboswitch is clearly seen in the crystal structure of the adenine-RNA complex.<sup>13</sup> By using the adenine analog 2-aminopurine (2-AP), a fluorescent base whose activity is quenched when it is bound to another molecule, Lemay et al.,<sup>25</sup> reported that there exist a correlation between binding of this analog to the adenine riboswitch and the ability of loops L2 and L3 to interact. They also showed by mutagenesis studies that, although half of the residues involved in the loop-loop interaction are phylogenetically conserved, a lot of changes are tolerated and even the two loops can be swapped with only a marginal effect on adenine binding.<sup>25</sup>

Next they performed single-molecule FRET studies to infer how the riboswitch folds, observing three different conformational states: the unfolded state (U), which presents the three helices (P1, P2 and P3) with no tertiary interaction; the folded state (F), similar to the anterior but in which the loop-loop interaction is present, bringing helices P2 and P3 close to each other, preparing the riboswitch for ligand binding. They also observed an intermediate state (I), whose presence was not detected in the previous ensemble FRET studies, showing the high discriminatory power of single-molecule assays (Fig. 2).<sup>25</sup> It was hypothesized that the intermediate state represents a conformer in which helices P1 and P3 are stacked, prepared for the Watson-Crick base pair interaction between adenine and RNA to occur and the subsequent compaction of the structure into the folded state.<sup>26</sup> But identification of folding intermediates have to await the use of another biophysical technique, FMOT.

### Folding Intermediates of the Adenine-Binding Riboswitch

In FMOT, also known as optical traps or optical tweezers, a laser beam is tightly focused, exerting radiation pressure on a micron-sized

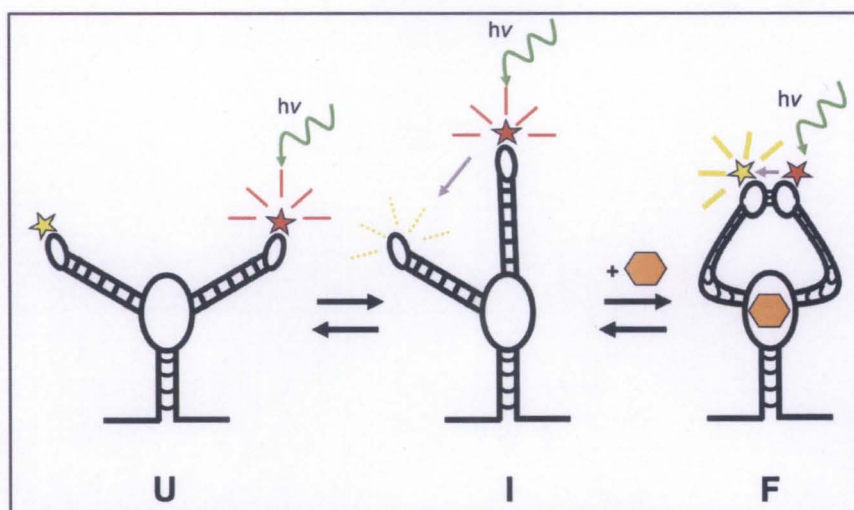


Figure 2. Formation of a tertiary contact between loops L2 and L3 of the adenine riboswitch as studied by FRET. U, I and F represent the unfolded, intermediate and folded states of the adenine riboswitch, respectively. The pair of fluorophores used as probes for FRET are denoted as yellow and red stars. Adenine is shown as an orange hexagon.

dielectric sphere to which one end of the molecule of interest is attached; the other end of the molecule is usually tethered to a micropipette or to a second sphere in the dual-trap configuration (Fig. 3).<sup>27</sup> The trapped sphere is polarized by the strong electromagnetic field gradient near the focus and experiences a force proportional to the gradient of the light intensity. There exist two ways of modulating the force applied, that is in the range of 0.1 to 100 pN, either by altering the position of the bead with respect to the trap center or by changing the intensity of the laser light. The wavelengths used are in the infrared region, in order to minimize damage to the macromolecules used.<sup>27</sup> The position of the sphere can be measured to within 0.1 nm, well fitted for nucleic acids, considering a length of 0.59 nm per nt for RNA.<sup>28</sup> As a consequence, optical traps have been used to study the folding of nucleic acids.<sup>19,20,29</sup>

As in FMOT changes in extension can be related to the number of nucleotides participating in folding, this technique was used to observe the folding of the adenine riboswitch.<sup>30</sup> As folding and transcription are concomitant events, they devised a system to observe mRNA folding as it is transcribed *in situ* (Fig. 3). To this end, a single RNA Polymerase (RNAP) molecule was attached to a sphere held in one optical trap. The RNAP is also bound to a template DNA containing a T7 RNAP promoter and downstream a sequence coding for the adenine riboswitch. Transcription was started and stalled after the synthesis of the first 29 nt, and the transcript is hybridized to a DNA handle that is attached to a second sphere, held in the other trap in such a way that force can be applied to the RNA by moving one of the optical traps (Fig. 3). It was shown that the initial transcript was completely unstructured. After that, transcription was restarted by the addition of ribonucleotides and allowed to transcribe the riboswitch, preventing RNAP of further transcription by means of a streptavidin molecule bound to the 5' end of the biotin-labeled template that blocked transcript elongation.

The authors were able to see the folding of each structural element in the riboswitch by unfolding it completely and taking length measurements of the RNA molecule subjected to a stepwise



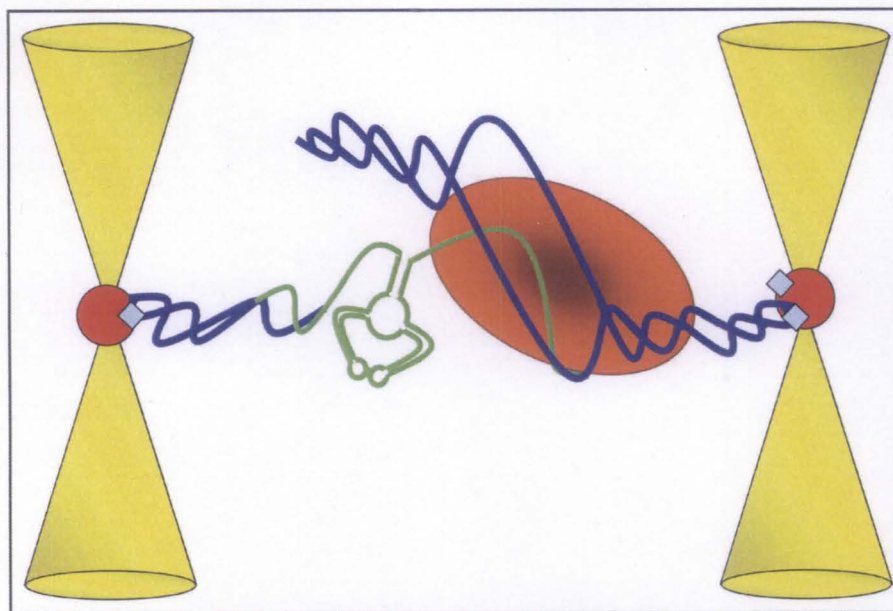


Figure 3. Experimental setup of the optical trapping assay. Focused laser beams are shown as yellow cones. Red circles represent the micron-sized spheres. RNAP, transcript and template DNA are depicted as an orange ellipse, green and blue lines, respectively. Biotin-streptavidin complexes are shown as blue diamonds.

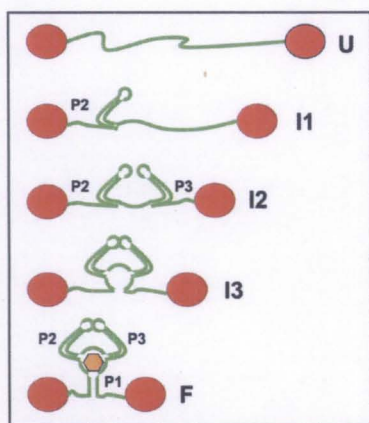


Figure 4. Changes in length represent the refolding of the adenine riboswitch at stepwise decreasing force, showing the different structural elements as they are formed. Red circles show the micron-sized spheres, RNA is shown as a green line and adenine as an orange hexagon. U, I1, I2, I3 and F represent the unfolded state, intermediate states 1, 2 and 3 and folded state, respectively, as referred in the text.

decreasing force. The first helix formed was helix P2, that is also the first element that is transcribed and the most stable of all (I1 in Fig. 4). They speculate that structuring of helix P2 inhibits the formation of alternative, competing structures that will block the proper folding of the riboswitch. It is an interesting hypothesis as it happens to be a general characteristic that P2 stems are the most stable ones in other riboswitches like the ones that bind thiamin pyrophosphate, glycine, adenosyl cobalamin, lysine, glucosamine-6 phosphate and S-adenosyl methionine (data not shown).

The second element to fold is helix P3 (I2 in Fig. 4). They were able to identify with precision which helix was formed in each case by using antisense oligonucleotides directed against each of the helices, blocking their folding separately. Folding of helices P2 and P3 was shown to be independent of the presence of adenine. The formation of the next intermediate was shown to be adenine-dependent. In intermediate I3, helices P2 and P3 are folded and the loop-loop interaction is present, leading to the preorganization of the adenine-binding pocket, but helix P1 is not formed, as shown in Figure 4. Finally, the state showing the shortest length represents the completely folded, adenine-bound state, in which P1, P2 and P3 helices are present (F in Fig. 4).

## Conclusions

Riboswitches, as other RNA molecules, must fold into complex 3D structures to accomplish their diverse functions. So far, RNA single-molecule studies are unique in their ability to elucidate the intermediate conformational states and the complex dynamics that lead to acquisition of its native, functional structure. Although FRET and FMOT are very powerful methods, both techniques could be combined in the near future so one would be able to identify directly which structural element of an RNA molecule is folding, as envisioned by Tinoco.<sup>22</sup> Refinements of these techniques will ultimately allow a very exciting thing: the study of RNA folding inside a living cell.

## Acknowledgements

The authors wish to acknowledge support from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) of the National Autonomous University of Mexico (UNAM, grant IN204707 PAPIIT). MTFI thankfully acknowledges a fellowship from Conacyt.



## References

1. Miranda Ríos J, Navarro M, Soberón M. A conserved RNA structure (*thi* box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:9736-41.
2. Winkler WC, Cohen-Chalamish S, Breaker RR. An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:15908-13.
3. Nahvi A, Sudarsan N, Ebert MS, Zou X, Brown KL, Breaker RR. Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem Biol* 2002; 9:1043-9.
4. McDaniel BAM, Grundy FJ, Artsimovitch I, Henkin TM. Transcription termination control of the S box system: direct measurement of S-adenosylmethionine by the leader RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:3083-8.
5. Mandal M, Breaker RR. Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11:29-35.
6. Mandal M, Boese B, Barrica JE, Winkler WC, Breaker RR. Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* 2003; 113:577-86.
7. Mandal M, Lee M, Barrick JE, Weinberg Z, Emilsson GM, Ruzzo WL, Breaker RR. A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science* 2004; 306:275-9.
8. Grundy FJ, Lehman SC, Henkin TM. (2003) The L-box regulon: lysine sensing by leader RNAs of bacterial lysine biosynthesis genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:12057-62.
9. Winkler WC, Nahvi A, Roth A, Collins JA, Breaker RR. Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* 2004; 428:281-6.
10. Cromie MJ, Shi Y, Latifi T, Groisman EA. An RNA sensor for intracellular Mg<sup>2+</sup>. *Cell* 2006; 125:71-84.
11. Grundy FJ, Henkin TM. From ribosome to riboswitch: control of gene expression in bacteria by RNA structural rearrangements. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2006; 41: 329-38.
12. Batey RT, Gilbert SD, Montange RK. Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine. *Nature* 2004; 432:411-5.
13. Serganov A, Yuan YR, Pikovskaya O, Polonskaia A, Malinina L, Phan AT, Hobartner C, Micura R, Breaker RR, Patel DJ. Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs. *Chem Biol* 2004; 11:1729-41.
14. Revyankin A, Liu C, Ebricht RH, Strick TR. Abortive initiation and productive initiation by RNA Polymerase involve DNA scrunching. *Science* 2006; 276:1109-12.
15. Wuite GJ, Smith SB, Young M, Keller D, Bustamante C. Single-molecule studies of the effect of template tension on T7 DNA Polymerase activity. *Nature* 2000; 404:103-6.
16. Altman D, Sweeney HL, Spudich JA. The mechanism of myosin VI translocation and its load-induced anchoring. *Cell* 2004; 116:737-49.
17. Yildiz A, Tomishige M, Vale RD, Selvin PR. Kinesin walks hand-over-hand. *Science* 2004; 303:676-8.
18. Mallik R, Carter BC, Lex SA, King SJ, Gross SP. Cytoplasmic dynein functions as a gear in response to load. *Nature* 2004; 427:649-52.
19. Liphardt J, Onoa B, Smith SB, Tinoco I Jr, Bustamante C. Reversible unfolding of single RNA molecules by mechanical force. *Science* 2001; 292:733-6.
20. Gore J, Bryant Z, Nöllman M, Le MU, Cozzarelli NR, Bustamante C. DNA overwinds when stretched. *Nature* 2006; 442:836-9.
21. Zhuang X. Single-molecule RNA science. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2005; 34:399-414.
22. Tinoco Jr, I. Force as a useful variable in reactions: unfolding RNA. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2004; 33:363-85.
23. Stryer L, Haughland RP. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967; 58:719-26.
24. Moerner WE, Fromm DP. Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy. *Rev Sci Instrum* 2003; 74:3597-619.
25. Lemay JF, Penedo JC, Tremblay R, Lilley DM, Lafontaine DA. Folding of the adenine riboswitch. *Chem Biol* 2006; 13:857-68.
26. Gilbert SD, Batey RT. Riboswitches: fold and function. *Chem Biol* 2006; 13:805-7.
27. Greenleaf, WJ, Woodside, MT, Block, SM. High-resolution single-molecule measurements of biomolecular motion. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2007; 36:171-90.
28. Saenger, W. Principles of nucleic acid structure. Springer, New York 1984.
29. Woodside, MT, Behnke-Parks, WM, Larizadeh K, Travers K, Herschlag D, Block SM. Nanomechanical measurements of the sequence-dependent folding landscapes of single nucleic acid hairpins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:6190-5.
30. Greenleaf, WJ, Frieda, KL, Foster DAN, Woodside MT, Block SM. Direct observation of hierarchical folding in single riboswitch aptamers. *Science* 2008; 319:630-3.