



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

PAPEL DIFERENCIAL DE LA AMINOPEPTIDASA N Y LA
FOSFATASA ALCALINA COMO RECEPTORES FUNCIONALES
DE LAS TOXINAS Cry1As DE *Bacillus thuringiensis*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. C. BIVIANA FLORES ESCOBAR

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ISABEL GÓMEZ

INTEGRANTES DE COMITÉ TUTORAL:

DRA. LAURA PALOMARES AGUILERA (IBT – UNAM)

DRA. ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ (IFC – UNAM)

CUERNAVACA, MORELOS

Noviembre de 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Contenido

Índice de Figuras	iv
Índice de Tablas.....	v
Lista de Abreviaturas.....	vi
Resumen.....	vii
Abstract	viii
Introducción	1
El control biológico como alternativa para proteger al medio ambiente.....	1
<i>Bacillus thuringiensis</i> : una bacteria con actividad insecticida	2
Toxinas Cry	3
Las toxinas Cry: su conformación tridimensional y la función de sus dominios	3
Dominio I	4
Dominio II	5
Dominio III	6
Mecanismo de acción de las toxinas Cry.....	6
Solubilización del cristal proteico.....	7
Activación de la toxina	7
Modelo de activación de PKA.....	8
Modelo de <i>Ping - Pong</i>	8
Interacción de baja afinidad con los receptores anclados por GPI	8
Interacción con el receptor tipo caderina	9
Interacción de alta afinidad con los receptores anclados por GPI	9
Antecedentes	11
Interacción de los receptores con las toxinas Cry1A	11
Receptor tipo caderina.....	11
Aminopeptidasa N.....	13
Fosfatasa alcalina	16
El RNA de interferencia como herramienta para el estudio de la participación de los receptores anclados por GPI en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1As.....	17
Hipótesis.....	20
Objetivo General	20

Objetivos Particulares	20
Materiales y Métodos	21
Purificación de VMMA de <i>M. sexta</i>	22
Purificación de los cristales de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac	22
Solubilización y tripsinización de la toxina	23
Experimento de unión a ligando o <i>ligand blot</i>	24
<i>Western blot</i> de las proteínas del intestino de larvas de <i>M. sexta</i>	24
Cuantificación de proteínas	24
Método de Lowry	24
Método de Bradford	25
Obtención de la secuencia codificante de la fosfatasa alcalina de <i>M. sexta</i>	25
Expresión heteróloga de la fosfatasa alcalina de <i>M. sexta</i>	25
Análisis de las afinidades de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac mediante Resonancia Superficial de Plasmones.....	26
Alineamiento de las Aminopeptidasas N de <i>M. sexta</i> y las Fosfatasas alcalinas de los lepidópteros	26
Clonación en LITMUS28i.....	27
Preparación de células de <i>E. coli</i> Químico competentes	27
Transformación por choque térmico	28
Transcripción <i>in vitro</i>	28
Interferencia de APN1, ALP y Bt-R1	28
RT-PCR cuantitativo y cualitativo	29
Bioensayos con las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac.....	30
Clonación del receptor tipo caderina, aminopeptidasa N1 y fosfatasa alcalina para expresión en líneas celulares	30
Resultados	32
Actividad biológica de las toxinas Cry1As en el lepidóptero <i>M. sexta</i>	32
Expresión de Aminopeptidasa N1, Fosfatasa Alcalina y receptor tipo Caderina en el desarrollo larvario del lepidóptero <i>M. sexta</i>	32
Unión de las toxinas Cry1A con las proteínas de las vesículas de la membranas de la microvellosidad apical del intestino de <i>M. sexta</i> durante el desarrollo larvario.....	34
La fosfatasa alcalina de <i>M. sexta</i> como proteína de unión de las toxinas Cry1A	35
a) Obtención de la secuencia nucleotídica de la fosfatasa alcalina de <i>M. sexta</i>	35

b) La fosfatasa alcalina recombinante de <i>M. sexta</i> como proteína de unión de las toxinas Cry1A	38
Silenciamiento de APN1 y ALP en larvas de <i>M. sexta</i> : alimentación con RNAdc.....	39
Participación de la Aminopeptidasa N1 y Fosfatasa Alcalina de <i>M. sexta</i> , en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1As	42
La aminopeptidasa N1 y la fosfatasa alcalina también participan en el mecanismo de acción de la toxina Cry1AbMod y Cry1AcMod	46
El receptor tipo caderina tiene una participación diferencial en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1As.....	47
Expresión de los receptores de las toxinas Cry1As, en <i>M. sexta</i> , en la línea celular de <i>Spodoptera frugiperda Sf21</i>	48
Discusión	50
Conclusiones	56
Perspectivas	58
Referencias bibliográficas	59
Anexo 1. Publicación derivada directamente de este proyecto.	A
Anexo 2. Colaboración de la estudiante en otro proyecto.	B
Anexo 3. Colaboración de la estudiante en capítulos de libro.....	C

Índice de Figuras

Figura No. 1 Estructura tridimensional de las toxinas Cry con diversas especificidades.	4
Figura No. 2 Topología estructural de la toxina Cry1Aa (PDB: 1C1Y).	5
Figura No. 3 Modelo de activación de PKA.	8
Figura No. 4 Mecanismo molecular de acción propuesto para describir la actividad de la toxina Cry1Ab en <i>M. sexta</i> .	10
Figura No. 5 Representación esquemática del mecanismo general del RNA de interferencia.	18
Figura No. 6 Diferencias estructurales y de actividad de las toxinas Cry1As.	32
Figura No. 7 Análisis de la expresión de ALP, APN1 y el receptor tipo Caderina en las vesículas de membrana de la microvellosidad apical durante los cinco estadios larvarios de <i>M. sexta</i> .	33
Figura No. 8 Expresión de los transcritos de ALP y APN1 durante el desarrollo larvario de <i>M. sexta</i> .	34
Figura No. 9 Unión de las toxinas Cry1As a las proteínas de las vesículas de membrana de la microvellosidad apical durante el desarrollo larvario de <i>M. sexta</i> .	35
Figura No. 10 Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de la Fosfatasa Alcalina de <i>M. sexta</i> y las fosfatasas alcalinas descritas en otros lepidópteros.	37
Figura No. 11 Análisis de SPR de la unión de Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac a la fosfatasa alcalina de <i>M. sexta</i> inmovilizada.	38
Figura No. 12 Representación esquemática de la localización de las regiones seleccionadas para silenciar APN1 o ALP.	40
Figura No. 13 Expresión relativa del transcrito y de la proteína de los receptores anclados por GPI.	41
Figura No. 14 Análisis de especificidad del silenciamiento de APN1.	42
Figura No. 15 Efecto diferencial del RNA de doble cadena en larvas, de <i>M. sexta</i> , retadas con las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac.	44
Figura No. 16 Disminución de la expresión de los transcritos y las proteínas de ALP y APN1 en larvas tratadas con RNA de doble cadena que sobrevivieron al reto	

con las toxinas Cry1As.	45
Figura No. 17 Efecto del RNAdc en larvas de <i>M. sexta</i> expuestas con la toxina Cry1AbMod (a) y Cry1AcMod (b).	47
Figura No. 18 Efecto diferencial del RNA de doble cadena de BtR1 en larvas, de <i>M. sexta</i> , retadas con 25 ng/cm ² de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac.	58
Figura No. 19 Clonación de las tres moléculas descritas como receptores de las toxinas Cry1As.	49

Índice de Tablas

Tabla No. 1 Interacción de Caderina de los lepidópteros con las toxinas Cry1A de <i>B. thuringiensis</i> .	13
Tabla No. 2 Interacción de APN de diversos lepidópteros con las toxinas Cry1 de <i>B. thuringiensis</i> .	15
Tabla No. 3 Interacción de ALP de los lepidópteros con las toxinas Cry1 de <i>B. thuringiensis</i> .	17
Tabla No. 4 Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.	21
Tabla No. 5 Medios y soluciones empleados en este estudio.	21
Tabla No. 6 <i>Primers</i> diseñados para amplificar las regiones para silenciar la expresión de APN1 y ALP.	37
Tabla No. 7 <i>Primers</i> diseñados para la reacción de RT-PCR cuantitativo.	29
Tabla No. 8 <i>Primers</i> diseñados para clonar a los receptores en los vectores de expresión de líneas celulares de insecto.	31

Lista de Abreviaturas

DNA c	Ácido Desoxirribonucleico complementario
ALP	Fosfatasa Alcalina
APN	Aminopeptidasa N
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _{dc}	Ácido Ribonucleico de doble cadena
RNA i	Ácido Ribonucleico de interferencia
<i>B. mori</i>	<i>Bombyx mori</i>
<i>B. thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bt – R1	Receptor tipo caderina de <i>M. sexta</i>
GalNac	N-acetil galactosamina
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
<i>H. armigera</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>
<i>H. virescens</i>	<i>Heliothis virescens</i>
IPTG	Isopropil β-D- tiogalactopiranósido
kDa	Kilodaltones
<i>M. sexta</i>	<i>Manduca sexta</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenil metanosulfonil
PVDF	Fluoruro de polivinidileno
SDS PAGE	Electroforesis de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
<i>S. exigua</i>	<i>Spodoptera exigua</i>
<i>S. frugiperda</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SPR	Resonancia superficial de plasmones
VMMAs	Vesículas de la microvellosidad media apical

Resumen

La aminopeptidasa N1 (APN1) y la fosfatasa alcalina (ALP), de *M. sexta*, han sido descritos *in vitro* como receptores de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*. La funcionalidad *in vivo* de ALP y APN1 como receptores de estas toxinas, fue demostrada en este estudio. Los ensayos de unión *in vitro* de las toxinas Cry1As a APN1 y ALP, mostraron que esta unión es diferencial: las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab se unen preferencialmente durante los primeros estadios de desarrollo a ALP, mientras que Cry1Ac se une únicamente a APN1.

La ALP es una molécula cuya función como receptor está siendo estudiada, en este trabajo se validó su participación en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1As. Para validarla como proteína de unión, el gen de ALP fue clonado y expresado en *E. coli*. La unión de esta proteína recombinante con las toxinas Cry1As fue caracterizada mediante estudios de SPR, observándose que se une a las tres toxinas Cry1As. La afinidad de ALP por la toxina Cry1Aa y Cry1Ab fue similar, mientras que la unión con la toxina Cry1Ac fue 16 veces menor.

La actividad funcional *in vivo* de APN1 y ALP fue estudiada mediante ensayos de RNA de interferencia en las larvas de *Manduca sexta*. Al igual que con el ensayo *in vitro*, se observó un efecto diferencial en los mecanismos de acción de las toxinas Cry1As. La toxina Cry1Aa depende de la participación de APN1 y ALP; la toxina Cry1Ab depende también de la participación de ambos receptores, pero ALP tiene un rol predominante; mientras que con la toxina Cry1Ac, APN1 ejerce un papel preponderante en comparación con ALP. En la toxina Cry1AbMod y la toxina Cry1AcMod, diseñadas para superar la resistencia de algunos organismos a la toxina Cry1Ab y Cry1Ac, los cuales están afectados en el receptor primario del mecanismo de acción de las toxinas Cry1A, se pudo observar el mismo efecto diferencial que se registró con la toxina Cry1Ab y Cry1Ac silvestre. Este resultado nos indica que estos receptores también son requeridos para el mecanismo de acción de la toxina.

El receptor tipo caderina es otra molécula descrita como receptor de las toxinas Cry1As. En este estudio, se llevó a cabo la interferencia de su expresión y se encontró que hay una dependencia diferencial de estas toxinas Cry1As. Tanto la toxina Cry1Aa y Cry1Ab dependen del receptor tipo caderina para ejercer su efecto tóxico; sin embargo, la toxina Cry1Ac no requiere de esta proteína en su mecanismo de acción. Es posible que exista otra molécula que esté supliendo el rol del receptor tipo caderina en el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ac.

Abstract

M. sexta Aminopeptidase N1 (APN1) and Alkaline Phosphatase (ALP) proteins have been described as receptors for *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac toxins *in vitro*. However, there was not enough evidence that proved their role *in vivo* in the mechanism of action of Cry1A toxins. In this study, we demonstrated the functional activity of APN1 and ALP, as receptors for these toxins. First, we performed *in vitro* binding assays of Cry1As toxins and we showed that binding to the midgut proteins is differential: Cry1Aa and Cry1Ab toxin preferentially bind to ALP in the *M. sexta* early larval instars, while Cry1Ac only binds to APN1.

ALP is a molecule whose function as receptor is recently being explored; in this work, its participation as receptor in the mechanism of action of the Cry1A toxins was validated. For this purpose, the protein was cloned and expressed in *E. coli*. The binding of this recombinant protein to the Cry1As toxins was characterized through SPR assays. The results showed that ALP binds to the three Cry1A toxins: the affinity to Cry1Aa and Cry1Ab toxins was similar, but the affinity to the Cry1Ac toxin was 16 times lower.

We analyzed the role of APN1 and ALP *in vivo* in *M. sexta* larvae through the RNA interference technique. We observed the same effect as the *in vitro* assays: there is a differential participation of both protein receptors in the mechanism of action of the Cry1A toxins. Both Cry1Aa and Cry1Ab toxins rely on the participation of both proteins to exert its toxic effect, however, ALP has a major role in the mechanism of action of the Cry1Ab toxin. On the other hand, the Cry1Ac toxin depends on the participation of APN1 in its mechanism of toxicity. In the case of the Cry1AbMod and Cry1AcMod mutant toxins, we observed similar effect as the wild type toxins. These results made us conclude that both ALP and APN1 proteins are receptors of the Cry1A toxins, and they have different roles in their mechanism of action.

The Cadherin-like protein is another molecule described as receptor for Cry1A toxins. We performed the expression interference of this receptor, and we found out that there is also a differential dependence of the Cry1A toxins with this protein. Both Cry1Aa and Cry1Ab toxins depend on the participation of this molecule to exert their toxic effect; however, the Cry1Ac toxin does not require this protein in its mechanism of action. We hypothesize that there is another molecule that is taking the role of the cadherin-like receptor in this mechanism of action.

Introducción

El control biológico como alternativa para proteger al medio ambiente

De más de 1 millón de especies conocidas de insectos, unas 10,000 especies se alimentan de cultivos agrícolas, y de ellas a nivel mundial, aproximadamente 700 especies causan la mayor parte del daño a estos cultivos, tanto en el campo como en el almacenamiento. Controlar las poblaciones de estos insectos plaga ha sido siempre objeto de interés del ser humano, las formas de llevar a cabo este control han variado a través de los años.

Al comienzo de la II Guerra Mundial (1940) comenzó la introducción de un nuevo concepto en el control de insectos, los insecticidas orgánicos sintéticos, el primero de los cuales fue el DDT. Las consecuencias del uso de los insecticidas químicos sobre el ser humano van desde daños en el sistema nervioso central y alergias, hasta efectos carcinogénicos; por otro lado, también existen repercusiones nocivas sobre el entorno ecológico donde son aplicados estos insecticidas. Más del 98% de los insecticidas fumigados y del 95% de los herbicidas llegan a un destino diferente del buscado, incluyendo especies vegetales y animales, aire, agua, sedimentos de ríos y mares y alimentos. Estos problemas plantearon la necesidad de emprender la búsqueda y empleo de nuevas alternativas para reducir el efecto negativo que provocaba el uso de insecticidas químicos, tanto para el medio ambiente, como para el ser humano (www.epa.gov).

Durante los últimos años, el empleo de alternativas racionales para controlar las poblaciones de organismos plaga que afectan la producción de plantas de uso comestible se ha convertido en un objetivo importante para la agricultura. El empleo de pesticidas biológicos o biopesticidas es una alternativa que puede disminuir de forma considerable el uso de pesticidas convencionales y su impacto ambiental, así como ayudar a mantener una producción alta del cultivo. Los biopesticidas generalmente afectan sólo a las plagas objetivo y a organismos cercanamente relacionados, en contraste con los pesticidas convencionales de amplio espectro que pueden afectar a diferentes organismos. Otra característica importante de estos pesticidas biológicos es que son efectivos en dosis bajas y se descomponen rápidamente, resultando en bajas exposiciones y evitando en gran medida los problemas de contaminación causados por los pesticidas convencionales (www.sagarpa.gob.mx).

Los biopesticidas pueden controlar varios tipos de plagas, aunque cada ingrediente activo es relativamente específico para sus plagas blanco. Los pesticidas biológicos empleados

más ampliamente son las cepas y subespecies de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Cada cepa de esta bacteria produce una mezcla diferente de proteínas que mata de forma específica a una o algunas cuantas especies relacionadas de larvas de insectos.

***Bacillus thuringiensis*: una bacteria con actividad insecticida**

La actividad insecticida de la bacteria *Bt* fue reconocida mucho tiempo antes de que fuera identificada. Algunos reportes han sugerido había sido utilizada previamente en civilizaciones antiguas como la egipcia y china (Sanahuja *et al.*, 2011; Ibrahim *et al.*, 2010). En la era moderna fue aislada por primera vez hacia el año 1901 por el biólogo japonés Shigetane Ishiwatari, cuando investigaba la causa de la enfermedad del colapso súbito en los gusanos de la seda (*Bombyx mori*), la cual estaba mermando las poblaciones de estos organismos. Diez años después, Ernst Berliner aisló esta misma bacteria de la palomilla mediterránea de la harina (*Ephesia kuehniella*) en la provincia alemana de Thuringia, por esta razón recibió el nombre de *Bacillus thuringiensis* (Siegel, 2000).

Bt es una bacteria Gram-positiva, ubicua que pertenece a la familia *Bacillaceae*, se encuentra en el grupo de *Bacillus cereus* (*Bc*), que también incluye a *B. anthracis* (*Ba*), *B. mycooides*, así como a las más recientemente descritas *B. pseudomycoides* y *B. weihenstephanensis* (Sauka y Benitende, 2008). Este grupo se caracteriza por formar endoesporas y crecer en presencia de oxígeno.

Las similitudes genotípicas y fenotípicas de *Bt*, *Ba* y *Bc* dificultaron la diferenciación entre los miembros de este grupo, sin embargo, es posible distinguirlos por la actividad que tienen dentro de la naturaleza: tanto *B. anthracis* como *B. cereus* son patógenos de mamíferos. *B. anthracis* es el agente que causa el ántrax, una enfermedad a menudo letal para los seres humanos y animales, mientras que *B. cereus* es un patógeno humano oportunista que puede causar gastroenteritis, infecciones en los ojos y enfermedades periodontales, entre otras (Ibrahim *et al.*, 2010). *Bt* posee una característica que la distingue de los otros miembros del grupo, es definida por la habilidad de producir durante el proceso de esporulación cristales de naturaleza proteica que son tóxicos para distintos invertebrados, especialmente para larvas de insectos. Las diferencias entre los fenotipos presentes en el grupo de *B. cereus* se deben a la presencia de plásmidos que codifican para los factores de patogeneidad característicos de cada uno de los miembros de este grupo.

Los genes que confieren la capacidad de formación de cristales en *Bt* se encuentran contenidos en los plásmidos mencionados; entre estos genes se encuentran los que codifican para las toxinas Cry. Estas toxinas forman parte de los componentes proteicos que conforman los cristales producidos por *Bt*. La expresión de estas toxinas durante la fase de esporulación está regulada por una RNA polimerasa que es también sintetizada cuando las esporas se están formando (Schnepf *et al.*, 1998).

Toxinas Cry

Las toxinas Cry son específicas para diferentes órdenes de insectos, como coleópteros, dípteros, himenópteros y lepidópteros, así como también para otros invertebrados, como nemátodos y protozoarios. Se han utilizado ampliamente para controlar plagas en el campo, ya sea en la introducción de plantas transgénicas o como formulaciones de espray. Estas toxinas se han reconocido como formadoras de poro, cuya acción primaria es lisar el tejido digestivo de su insecto blanco. Una característica importante del uso de estas toxinas en el campo es su inocuidad para los mamíferos, ya que no provoca alergias ni enfermedades (Siegel, 2001), esto es debido a la especificidad de los sitios de unión en los insectos blanco (ver más adelante), que no están presentes en mamíferos (Whalon y Wingerd, 2003; Mesnage *et al.*, 2011).

Las toxinas Cry: su conformación tridimensional y la función de sus dominios

Las estructuras tridimensionales de ocho toxinas Cry con diferentes especificidades insecticidas han sido resueltas, entre las cuales se encuentran las toxinas Cry1Aa (específica para lepidópteros), Cry2Aa (activa contra dípteros y lepidópteros), Cry3Aa, Cry3Bb y Cry8Ea (específicas para coleópteros), Cry4Aa y Cry4Ba (específicas para dípteros) y Cry5Ba (específica para nemátodos) (Grochulski *et al.*, 1995; Morse *et al.*, 2001; Li *et al.*, 1991; Galitsky *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2009; Boonserm *et al.*, 2005, 2006; Hui *et al.*, 2012) (Figura No.1). Estas estructuras muestran una organización tridimensional similar, a pesar de la baja identidad en la secuencia de aminoácidos entre estas toxinas. En las estructuras de estas toxinas Cry, se observa que se encuentran organizadas en tres dominios que tienen una división funcional (Figura No.2a).

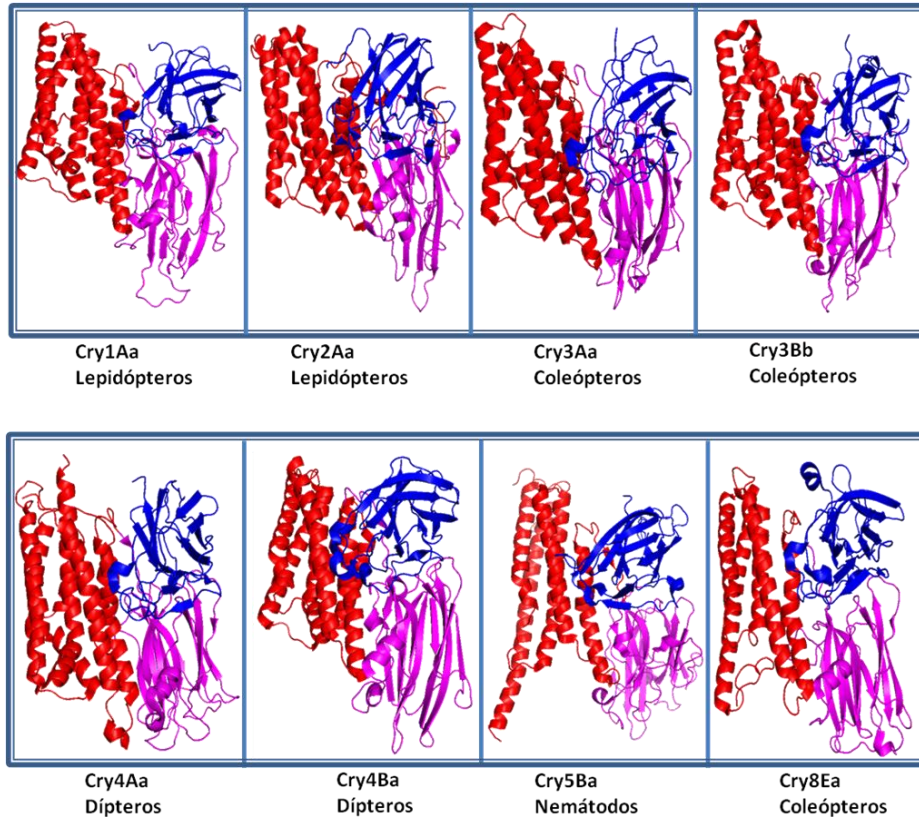


Figura No. 1 Estructura tridimensional de toxinas Cry con diversas especificidades. El dominio I está coloreado en rojo, mientras que el dominio II y III en rosa y azul, respectivamente. (Código Protein Data Bank: Cry1Aa, 1CIY; Cry2Aa, 1I5P; Cry3Aa, 1DLC; Cry3Bb, 1JI6; Cry4Aa, 2C9K; Cry4Ba, 1W99; Cry5Ba, 4D8M y Cry8Ea, 3EB7).

Dominio I

El dominio I forma un ramillete de siete α hélices antiparalelas con la hélice $\alpha 5$ en el centro, las hélices externas muestran una naturaleza anfipática (Figura No. 2b). La composición aminoacídica de estas hélices está dispuesta de la siguiente forma: los residuos cargados o polares están expuestos al solvente mientras que los residuos hidrofóbicos se orientan hacia la hélice central, la hélice $\alpha 5$. La identidad estructural que posee este dominio con el dominio de inserción en la membrana de la hemolisina, la colicina Ia y el dominio de translocación membranar de la toxina diftérica permiten inferir que este dominio está involucrado en la formación de poro. El análisis mediante mutagénesis sitio dirigida ha permitido determinar que la región del dominio I involucrada en la formación del poro en la membrana celular es la horquilla hidrofóbica de hélices $\alpha 4$ - $\alpha 5$, la cual experimenta un rearrreglo conformacional de la estructura terciaria con el fin de formar canales iónicos en la membrana (Zavala *et al.*, 2011).

Dominio II

El dominio II contiene tres hojas β antiparalelas y dos hélices α pequeñas (Figura No. 2b). Las primeras dos hojas β forman el motivo distintivo de la llave griega (Li *et al.*, 1991; Boonserm *et al.*, 2005). Estructuralmente este dominio es el más variable de las toxinas Cry, con asas de diferente longitud, conformación y secuencia. La longitud de las cadenas β también es altamente variable, las toxinas Cry2Aa y Cry4Ba son los ejemplos extremos (Boonserm *et al.*, 2006). Esta variabilidad en el dominio II sugiere que es un factor determinante de la especificidad de las toxinas. Las similitudes entre el ápice del dominio II y la región determinante complementaria de las inmunoglobulinas proponen que esta región está involucrada en unión a receptores; posteriormente, mutaciones en estas asas demostraron que estas regiones son importantes para determinar la especificidad por las moléculas receptoras. La estructura del dominio II ha sido comparada con otras proteínas con estructura β -prisma, incluyendo vitelina y la lectina vegetal de la jacalina y la aglutinina. La similitud estructural entre el dominio II y los dominios de la lectina ha permitido especular que puede unir carbohidratos, pero esto no ha sido demostrado (Piggot y Ellar, 2007).

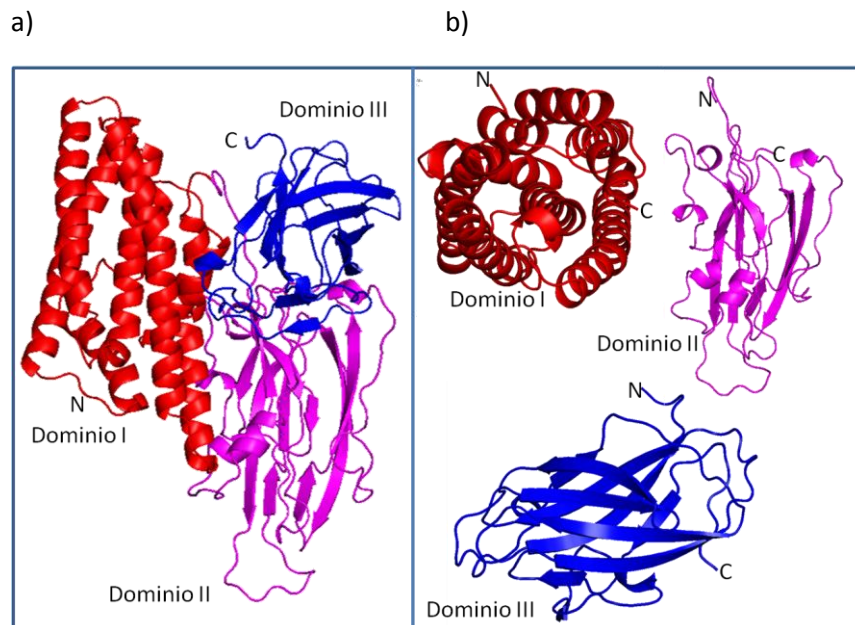


Figura No. 2 Topología estructural de la toxina Cry1Aa (PDB: 1C1Y). a) El dominio I está coloreado de rojo; mientras que el dominio II y el dominio III están representados en color rosa y azul, respectivamente. b) Rotación en z del dominio I, el dominio III se encuentra rotado 90°.

Dominio III

El dominio III es un emparedado β de dos láminas β antiparalelas (Figura No. 2b). Ambas láminas están compuestas de cinco cadenas, con la lámina externa expuesta al solvente y la lámina interna empacada hacia el dominio II. El dominio III muestra menos variabilidad estructural que el dominio II, las diferencias principales son: la longitud, orientación y secuencia de las asas. La importancia de estas diferencias es particularmente evidente con las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac, donde un asa forma una cavidad de unión para N-acetilgalactosamina, la cual está implicada en el reconocimiento de este azúcar en el receptor APN (Burton *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999). El dominio III ha mostrado tener una importante similitud con módulos proteicos de unión a carbohidratos encontrados en hidrolasas de glucósidos, liasas y esterasas; este hecho sugiere que algunas toxinas Cry, como la toxina Cry1Ac, pueden unir carbohidratos en esta región (Burton *et al.*, 1999). En varios estudios, este dominio ha sido involucrado como determinante de especificidad, así como también de unión a receptores. La β 16 del dominio III de la toxina Cry1Aa ha sido descrita como una región de unión con la APN de *B. mori* (Atsumi *et al.*, 2005); esta misma región en la toxina Cry1Ab ha sido mapeada como sitio de interacción con los receptores APN1 y ALP de *M. sexta* (Arenas *et al.*, 2010).

Mecanismo de acción de las toxinas Cry

Una de las características más importantes de las toxinas Cry es su especificidad hacia los insectos blanco. Esta especificidad está determinada en gran medida por la capacidad de unión específica de las toxinas Cry con las proteínas de la superficie de la microvellosidad de las células intestinales de las larvas de los insectos (Bravo *et al.*, 2011). En el caso de los insectos lepidópteros, entre las proteínas de unión de las toxinas Cry que han sido identificadas se encuentran: proteínas tipo caderina, proteínas ancladas por glicosilfosfatidil inositol (GPI) como APN y ALP, un glicoconjugado de 270 kDa y una proteína llamada P252 (Piggot y Ellar, 2007). Este mecanismo puede ser aún más complejo, ya que también se ha sugerido que otras moléculas pueden estar involucradas, tales como glicolípidos (Griffitts *et al.*, 2005), una α amilasa (Fernández – Luna *et al.*, 2010) y el transportador ABC (Gahan *et al.*, 2010).

El mecanismo de acción de las toxinas Cry ha sido extensivamente estudiado en lepidópteros, y en cierta medida en dípteros y coleópteros. Hasta el momento se han propuesto dos modelos para describir el mecanismo molecular de la actividad de las toxinas Cry activas contra insectos lepidópteros: el modelo de activación de la Proteína Cinasa A (PKA) (Zhang *et al.*, 2006) y el modelo de *ping pong* (Pacheco *et al.*, 2009). El

primer modelo fue sugerido mediante la expresión heteróloga del receptor tipo caderina de *M. sexta* en la línea celular High Five, de *Trichoplusia ni*, el modelo de *ping pong* fue propuesto con base en datos obtenidos en el insecto lepidóptero *M. sexta*, ambos han sido propuestos para describir la actividad de la toxina Cry1Ab. El modelo de activación de PKA sugiere que la sola interacción de la toxina con el receptor primario induce la muerte del insecto susceptible (Figura No. 3), mientras que el modelo de *ping pong* involucra la interacción con al menos tres moléculas después de que el cristal es ingerido por insectos susceptibles, finalizando con la formación de poro (Figura No. 4). Ambos modelos coinciden en los primeros pasos de solubilización y activación de la toxina dentro del intestino del insecto.

Solubilización del cristal proteico

Los cristales de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* son sintetizados como precursores inactivos y requieren de procesamientos posteriores dentro del intestino del insecto blanco para ejercer su actividad entomopatógena. Una vez que el cristal proteico es ingerido por el insecto susceptible, es solubilizado bajo las condiciones físico-químicas del ambiente del intestino del insecto. En el caso de Lepidópteros y Dípteros, la solubilización de los cristales es llevada a cabo en un ambiente con pH alcalino y reductor que permite desestabilizar los puentes disulfuro presentes en el extremo amino terminal de las toxinas Cry. En los Coleópteros, la solubilización de los cristales está dada a pHs ligeramente ácidos (Du *et al.*, 1994).

Activación de la toxina

La protoxina liberada es procesada en una toxina activa mediante la acción de proteasas, provenientes de *Bt* o del intestino del insecto blanco. El procesamiento de las protoxinas Cry1, las cuales tienen un tamaño de aproximadamente 130 kDa, comprende tanto el extremo amino y carboxilo terminal y resulta en toxinas activadas de un tamaño cercano a los 60 kDa. En las toxinas Cry1 y Cry4, el 50% de la protoxina es procesado para dar origen a una toxina madura donde se corta un péptido pequeño en el extremo amino terminal y un péptido largo en el extremo carboxilo terminal. El procesamiento proteolítico en otros grupos de toxinas Cry es variable; en el caso de las toxinas Cry2, un fragmento pequeño del extremo carboxilo terminal es removido durante la hidrólisis, y la toxina madura es ligeramente más pequeña que la protoxina; en cambio, en las toxinas Cry3, la protoxina es procesada en el extremo amino terminal (Rukmini *et al.*, 2000).

Modelo de activación de PKA

El modelo fue propuesto con base a las observaciones realizadas en ensayos de expresión heteróloga del receptor tipo caderina, de *M. sexta*, en la línea celular *High Five* de *T. ni*. Este modelo plantea que la toxina Cry1Ab se une específicamente al receptor tipo caderina, estimulando la proteína G y la Adenilato Ciclasa, esto conlleva la acumulación de AMPc y activación de la Proteína Cinasa A (PKA). La Proteína Cinasa A es el componente principal en esta vía de muerte celular, ya que altera a los efectores localizados río abajo de la cascada de la señalización, que finalmente desestabilizan a la célula: en el citoesqueleto y canales iónicos en la membrana celular (Zhang *et al.*, 2006) (Figura No. 3). El efecto de activación de PKA depende probablemente de la dosis de toxina empleada en ese estudio.

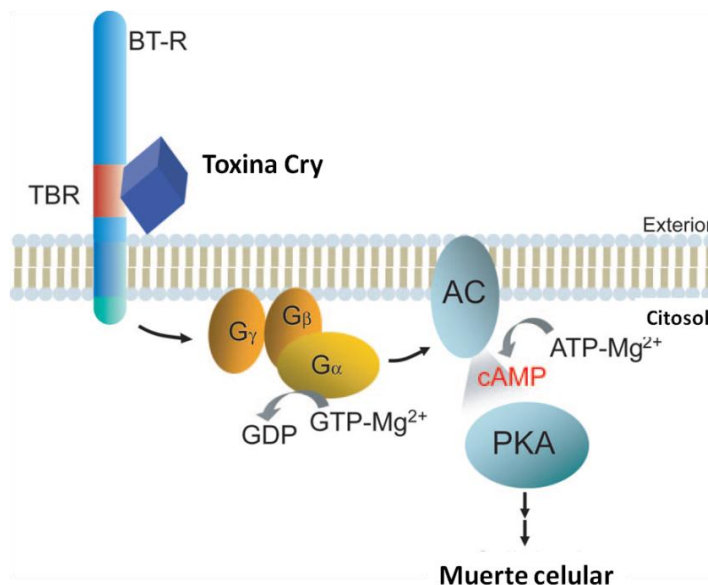


Figura No. 3 Modelo de activación de PKA. Adaptado de Zhang *et al.*, 2006.

Modelo de Ping - Pong

Interacción de baja afinidad con los receptores anclados por GPI

Después de la solubilización de las inclusiones cristalinas en el intestino medio y la activación de la toxina por proteasas, el fragmento activo liberado se une de forma secuencial con al menos tres moléculas receptoras localizadas en las células del epitelio del intestino medio (Figura No. 4) (Pacheco *et al.*, 2009; Arenas *et al.*, 2010). La primera interacción de la toxina Cry1Ab activada ocurre a través de regiones expuestas de

aminoácidos del dominio II (especialmente a través del asa 3) y dominio III (mediante la cadena β 16) de la toxina con APN y ALP de *M. sexta* que son abundantes y poseen baja afinidad por la toxina (Gómez *et al.*, 2006; Pacheco *et al.*, 2009; Arenas *et al.*, 2010). Estos receptores se localizan en balsas lipídicas de la membrana celular (Bravo *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2005). Esta interacción concentra la toxina activada en la membrana de las células de la microvellosidad del intestino del insecto.

Interacción con el receptor tipo caderina

La interacción de baja afinidad con los receptores anclados por GPI (Arenas *et al.*, 2010) es seguida por una unión de alta afinidad con el receptor tipo caderina (Vadlamudi *et al.*, 1995). La interacción con el receptor tipo caderina es una interacción compleja que involucra la participación de tres epítopes de esta proteína, que corresponden a las regiones extracelulares denominadas CR7, CR11 y CR12, donde CR12 es la región más proximal a la membrana celular. En *M. sexta*, *H. virescens* y *B. mori*, durante esta interacción la toxina se une al receptor tipo caderina mediante las asas α -8, 2 y el asa 3 del dominio II (Xie *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2006; Atsumi *et al.*, 2008). Esta interacción promueve el corte proteolítico de la hélice α 1 del dominio I, lo que resulta en la formación de un oligómero (Gómez *et al.*, 2002; Atsumi *et al.*, 2008). El corte proteolítico de la hélice α 1 expone regiones hidrofóbicas escondidas del dominio I y se ha hipotetizado que este corte es necesario para facilitar la formación de la estructura oligomérica (Gómez *et al.*, 2002).

Con base a las observaciones de Gómez *et al.*, 2002, las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac se modificaron genéticamente para eliminar la región N-terminal de la hélice α 1. Las toxinas Cry1AbMod y Cry1AcMod pueden formar oligómeros en ausencia del receptor tipo caderina. Estas observaciones tienen importancia biotecnológica, ya que se ha mostrado que estas variantes son capaces de contender con la aparición de mecanismos de resistencia asociadas al receptor tipo caderina en poblaciones del lepidóptero *Pectinophora gossypiella* resistentes a la toxina Cry1Ac (Soberón *et al.*, 2007), incluso a otras especies de lepidópteros como *Diatraea saccharalis* (cepa Bt-RR, resistente a la toxina Cry1Ab) y *Helicoverpa armigera* (cepa SCD-r1, resistente a la toxina Cry1Ac), cuya resistencia también se ha asociado al receptor tipo caderina (Tabashnik *et al.*, 2011).

Interacción de alta afinidad con los receptores anclados por GPI

La estructura oligomérica de la toxina Cry1Ab tiene una mayor afinidad por los receptores anclados por GPI, como la APN1 o fosfatasa alcalina en el caso de *M. sexta* ($K_d = 0.6$ nM para APN1 y 0.5 nM para ALP) (Arenas *et al.*, 2010) o *H. virescens* (Jurat – Fuentes y Adang,

2004). En esta unión de alta afinidad, el asa 2 del dominio II de la toxina Cry1Ab está involucrada (Arenas *et al.*, 2010). La unión del oligómero a los receptores anclados por GPI resulta en la inserción de éste en la membrana y la formación de poros, provocando un choque osmótico y la eventual muerte del organismo huésped (Pardo – López *et al.*, 2013).

De acuerdo con el modelo de *ping pong* o formación de poro, en *Manduca sexta*, la toxina Cry1Ab se une con tres moléculas: el receptor tipo caderina, la fosfatasa alcalina y la aminopeptidasa N. La unión observada *in vitro* de ALP con la toxina Cry1Ab (Arenas *et al.*, 2010), y APN1 con las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac (Masson *et al.*, 1995), puede involucrar a ambas proteínas en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1As; sin embargo, aún no es posible establecer que estas dos proteínas ancladas por GPI son participantes *in vivo* en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1As en *M. sexta*.

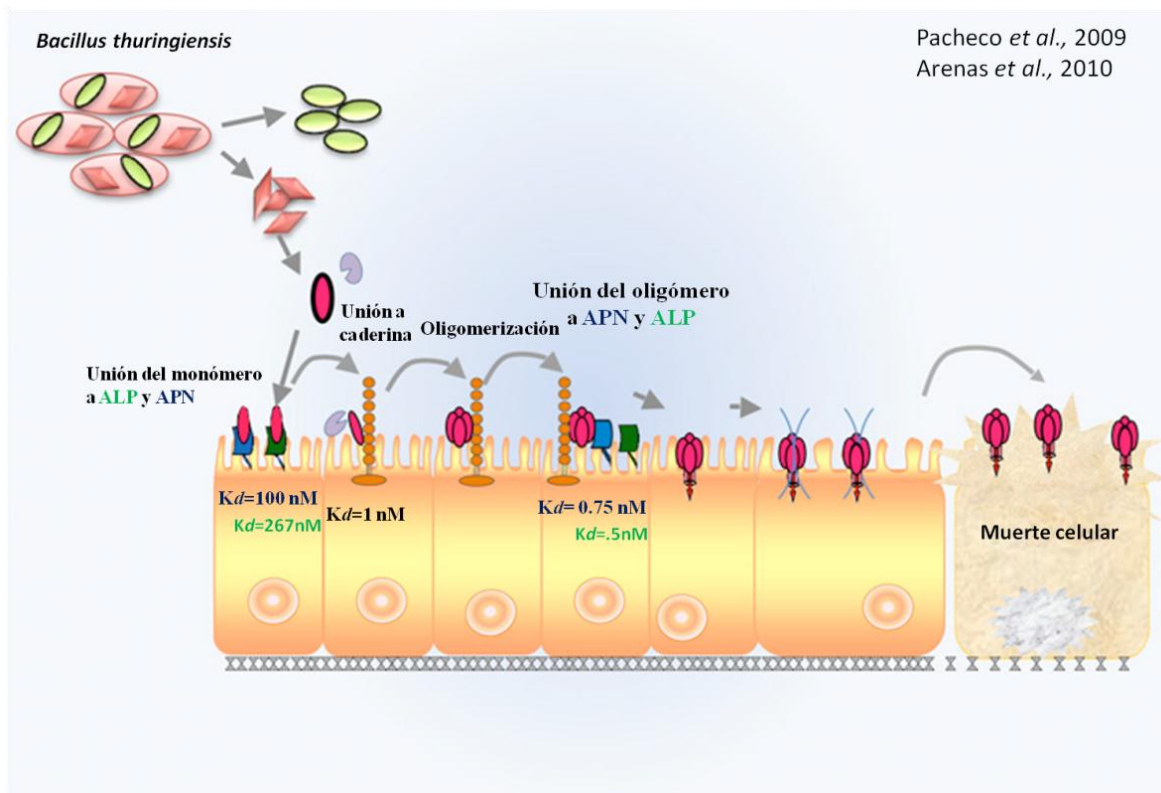


Figura No. 4 Mecanismo molecular de acción propuesto para describir la actividad de la toxina Cry1Ab en *Manduca sexta*.

Antecedentes

Interacción de los receptores con las toxinas Cry1A

La búsqueda e identificación de moléculas en los insectos susceptibles que están involucradas en la interacción de las toxinas Cry1A ha sido una tarea exhaustiva. La identificación de las moléculas de unión de las toxinas Cry1A se ha realizado básicamente mediante técnicas *in vitro*, como inmunoprecipitación, ensayos de *ligand blot* y recientemente, mediante estudios de proteómica, pero se tienen pocos datos que las validen como participantes *in vivo* del mecanismo de acción de las toxinas Cry1A.

Receptor tipo caderina

Las caderinas son una familia de moléculas de adhesión que son importantes para la asociación mutua de células de vertebrados. Estas moléculas juegan un papel importante en los mecanismos de diferenciación celular, confiriendo especificidades de adhesión a las células. Las caderinas son consideradas reguladores importantes de la morfogénesis porque controlan la polaridad celular y la morfología de los tejidos. Estas proteínas están definidas por la presencia de dominios de unión a Calcio o repetidos de caderina; las caderinas clásicas tienen 5 repetidos, pero también se han reportado hasta 34. Estas proteínas pueden tener un tamaño de aproximadamente 110 aminoácidos, están glicosiladas y generalmente están ancladas a la membrana mediante un dominio transmembranal (Alberts *et al.*, 2002).

Las moléculas tipo caderina de los lepidópteros, a diferencia de las descritas en otros eucariontes que están localizadas en la membrana basolateral, se han encontrado en la membrana apical del intestino medio de las células columnares del epitelio, el sitio blanco de las toxinas Cry. La expresión de la proteína tipo caderina varía durante el desarrollo del organismo e incrementa progresivamente desde el primero hasta el quinto estadio de desarrollo larvario de *M. sexta* (Midboe *et al.*, 2003). La función fisiológica exacta de las caderinas intestinales no es conocida. El control de los niveles de caderina durante el desarrollo larvario ha sido propuesto como un mecanismo de mantenimiento de la organización del epitelio intestinal.

Las proteínas tipo caderina de lepidópteros han sido extensamente estudiadas como receptores de las toxinas Cry, hay evidencia consistente que propone la participación *in vivo* de estas moléculas en el mecanismo de acción de estas toxinas (Tabla No. 1).

La primera proteína tipo caderina reportada en la interacción con las toxinas Cry fue la de *M. sexta*, Bt-R1, una glicoproteína de 210 kDa. Esta proteína une a las toxinas Cry1Aa,

Cry1Ab y Cry1Ac en ensayos de unión de ligando (Francis y Bulla, 1997). La unión de alta afinidad del receptor tipo caderina por las toxinas Cry1As ocurre en una región adyacente al dominio extracelular próximo a la membrana (MPED) (Dorsch *et al.*, 2002).

En diversos ensayos *in vitro* se ha demostrado que el receptor tipo caderina participa en el mecanismo de toxicidad de las toxinas Cry1A. La expresión heteróloga del receptor tipo caderina de los lepidópteros, *M. sexta* (Meng *et al.*, 2001; Dorsch *et al.*, 2002; Hua *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005), *B. mori* (Nagamatsu *et al.*, 1998; Nagamatsu *et al.*, 1999), *H. virescens* (Jurat-Fuentes y Adang, 2006) y *O. nubilalis* (Flannagan *et al.*, 2005), confiere susceptibilidad a las toxinas Cry1A.

En otros lepidópteros, las proteínas tipo caderina se han asociado a mecanismos de resistencia a las toxinas Cry, involucrando a estas proteínas de forma directa en el mecanismo de acción de estas toxinas: en el caso de la cepa YHD2 de *H. virescens* se reportó que el gen que codifica al receptor tipo caderina está truncado por la inserción de un retrotransposón y esto resulta en resistencia a la toxina Cry1Ac (Gahan *et al.*, 2001). Un caso similar se registró en una población resistente a la toxina Cry1Ac del lepidóptero *Pectinophora gossypiella*, que es plaga del algodón, donde se demostró que en los tres alelos de caderina hay deleciones que eliminan al menos ocho aminoácidos río arriba del posible sitio de unión con las toxinas Cry; las larvas que no tenían los alelos mutantes aún eran susceptibles a la toxina Cry1Ac (Morin *et al.*, 2003).

Las proteínas tipo caderina también han sido descritas como receptores de las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa en los mosquitos *Anopheles gambiae* (Hua *et al.*, 2008) y *Aedes aegypti* (Chen *et al.*, 2009), respectivamente. La unión de la proteína tipo caderina de *A. aegypti* con la toxina Cry11Aa mostró ser una unión de alta afinidad, lo cual sugiere que el mecanismo de acción de las toxinas Cry en dípteros puede ser similar al que se ha descrito en lepidópteros.

En el caso de los coleópteros, también se han descrito proteínas tipo caderina con capacidad de unión a las toxinas Cry. En *Tenebrio molitor*, el receptor tipo caderina es una molécula que une a la toxina Cry3Aa, facilita la oligomerización de la toxina, y en ensayos de RNA de interferencia, se observa que estos organismos son tolerantes a Cry3Aa (Fabrick *et al.*, 2009). En *Diabrotica virgifera virgifera*, el fragmento que contiene del repetido 8-10 de la proteína tipo caderina une con alta afinidad de 12 y 1.4 nM, a las toxinas Cry3Aa y Cry3Bb, respectivamente (Park *et al.*, 2009).

Tabla No. 1 Interacción de Caderina de los lepidópteros con las toxinas Cry1A de *Bacillus thuringiensis*

	Trabajos realizados <i>in vitro</i>	Trabajos realizados <i>in vivo</i>
<i>Manduca sexta</i>	Cry1Aa Francis y Bulla, 1997 Cry1Ab Francis y Bulla, 1997 Cry1Ac Francis y Bulla, 1997	
<i>Bombix mori</i>	Cry1Aa Nagamatsu <i>et al.</i> , 1998 Cry1Ab Tsuda <i>et al.</i> , 2003 Cry1Ac Hara <i>et al.</i> , 2003	
<i>Heliothis virescens</i>		Cry1Ac Gahan <i>et al.</i> , 2001
<i>Helicoverpa armigera</i>		Cry1Ac Xu <i>et al.</i> , 2005
<i>Ostrinia nubilalis</i>	Cry1Ab Flannagan <i>et al.</i> , 2005	
<i>Pectinophora gossypiella</i>		Cry1Ac Morin <i>et al.</i> , 2003

Aminopeptidasa N

La familia de las aminopeptidasas es una clase de enzimas que juega un rol importante en la degradación proteica durante la digestión. Catalizan el corte de aminoácidos localizados en el extremo amino terminal de péptidos y proteínas. Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas tanto en organismos procariontes como eucariontes (Gonzales y Robert - Baudouy, 1996); adicionalmente se ha sugerido que participan en el transporte de péptidos a través de la membrana de la microvellosidad intestinal (Antonov *et al.*, 1984). Las aminopeptidasas de insectos pertenecen a la familia de la aminopeptidasa N (APN) (Wang y Zhang, 2005) y se encuentran de forma abundante en la membrana apical de la membrana del intestino. En lepidópteros, cuatro isoformas de APN han sido identificadas (Nakanishi *et al.*, 2002). Estas diferentes isoformas de APN tienen diferentes especificidades a los residuos N-terminal de los sustratos proteicos y se encuentran ancladas por GPI a la membrana celular (Knight *et al.*, 1994; Hua *et al.*, 1998).

La APN fue la primera molécula descrita como receptor de las toxinas Cry para la toxina Cry1Ac por Knight *et al.*, (1994) y Sangadala *et al.* (1994). Existe una cantidad considerable de trabajos que proponen que la aminopeptidasa N es una proteína de unión *in vitro* de las toxinas Cry1A en lepidópteros (Masson *et al.*, 1995, Zhang *et al.*, 2009, Yaoi *et al.*, 1997, Valaitis *et al.*, 1997, Nakanishi *et al.*, 2002, Denolf *et al.*, 1997, Pacheco *et al.*, 2009).

En *M. sexta*, se han reportado cuatro isoformas de Aminopeptidasa N: APN1 (Knight *et al.*, 1994), APN2 (Denolf *et al.*, 1997), APN3 (Daniel *et al.*, datos sin publicar) y APN4 (Daniel y Adang, datos sin publicar); sin embargo, sólo se ha estudiado la participación *in vivo* de APN1 en el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ac. Esta participación ha sido abordada

mediante la expresión heteróloga de APN1 en la línea celular Sf21, pero no fue posible de verificar ya que la expresión de ésta no otorgó susceptibilidad a la toxina; esto es contrario al efecto que se observó con la expresión heteróloga del receptor tipo caderina (Luo *et al.*, 1999). En contraparte a los resultados obtenidos en el trabajo de Luo *et al.*, 1999, las observaciones obtenidas mediante la expresión transgénica de APN1 de *M. sexta* en larvas de *Drosophila melanogaster*, indican que esta expresión confiere susceptibilidad a la toxina Cry1Ac en estas larvas (Gill y Ellar, 2001), sugiriendo que APN1 puede funcionar como un receptor *in vivo* de la toxina Cry1Ac.

Los trabajos que implican a APN en el mecanismo de acción *in vivo* en otros lepidópteros son realmente escasos. En la última década se han realizado estudios *in vivo*, donde emplean el RNA de interferencia, para entender el papel de la APN como receptor funcional de las toxinas Cry1, en diversas especies de lepidópteros. En *Spodoptera litura* se observó que después de silenciar el gene de APN, los organismos eran menos susceptibles al efecto de la toxina Cry1Ca (Rajagopal *et al.*, 2002). En otro lepidóptero, *Diatraea saccharalis*, los ensayos realizados *in vivo* por Yang *et al.*, (2010) demostraron que al silenciar tres isoformas de aminopeptidasa resultaba en una disminución en la susceptibilidad a la toxina Cry1Ab.

La participación *in vivo* de la aminopeptidasa N en el mecanismo de acción de las toxinas Cry ha sido asociada con la aparición de resistencia a las toxinas Cry1, y ésta ha sido correlacionada con la disminución de la expresión de los transcritos o mutaciones en el gene de APN. En el caso de una cepa resistente a la toxina Cry1C de *Spodoptera exigua*, la disminución de la expresión del transcrito de APN1 ha sido asociada con la resistencia. En *Helicoverpa armigera* (cepa 96SBtR), una mutación en el gene de la aminopeptidasa N ha sido relacionada con la aparición de resistencia en esta cepa (Zhang *et al.*, 2009). En una cepa resistente a la toxina Cry1Ac de *Trichoplusia ni*, GLEN-Cry1Ac-BCS, tanto la expresión del RNA mensajero de APN1 como de la expresión de proteína de esta isoforma estaba disminuida, lo que los llevó a concluir que APN1, puede estar participando en el mecanismo de acción de Cry1Ac en ese organismo (Tiewsiri y Wang, 2011).

Tabla No. 2 Interacción de APN de diversos lepidópteros con las toxinas Cry1 de *Bacillus thuringiensis*

	Trabajos realizados <i>in vitro</i>	Trabajos realizados <i>in vivo</i>
<i>Manduca sexta</i>	Cry1Aa Masson <i>et al.</i> , 1995 Cry1Ab Masson <i>et al.</i> , 1995 Cry1Ac Masson <i>et al.</i> , 1995	Cry1Ac Gill y Ellar, 2002
<i>Bombix mori</i>	Cry1Aa Nakanishi <i>et al.</i> , 2002 Cry1Ab Nakanishi <i>et al.</i> , 2002	
<i>Diatraea sacharalis</i>		Cry1Ab Yang <i>et al.</i> , 2010
<i>Helicoverpa armigera</i>		Cry1Ac Zhang <i>et al.</i> , 2009
<i>Heliothis virescens</i>	Cry1Aa Yaoi <i>et al.</i> , 1997 Cry1Ab Yaoi <i>et al.</i> , 1997 Cry1Ac Luo <i>et al.</i> , 1997	
<i>Lymantria dispar</i>	Cry1Ac Valaitis <i>et al.</i> , 1997	
<i>Plutella xylostella</i>	Cry1Aa Nakanishi <i>et al.</i> , 2002 Cry1Ab Nakanishi <i>et al.</i> , 2002 Cry1Ac Denolf <i>et al.</i> , 1997	
<i>Spodoptera exigua</i>		Cry1Ca Herrero <i>et al.</i> , 2005
<i>Spodoptera litura</i>		Cry1Ca Rajagopal <i>et al.</i> , 2002
<i>Trichoplusia ni</i>		Cry1Ac Tiwiesiri y Wang, 2011

Existen trabajos donde se sugiere la participación de otros receptores tales como la fosfatasa alcalina, ya que en mutantes de la toxina Cry1Ac en el dominio III afectadas en la unión con APN se encontró que tenían un efecto marginal en toxicidad hacia *M. sexta* y posiblemente estas mutantes estén recurriendo a otra proteína de unión para ejercer su efecto tóxico (Jenkins *et al.*, 1999). Otro dato que sugiere la participación de otro receptor de la toxina Cry1Aa en *B. mori*, es el trabajo de Ibiza-Palacios *et al.*, 2008, en donde se observó que células disociadas del intestino de este organismo no fueron protegidas del efecto tóxico de Cry1Ab cuando eran incubadas con un anticuerpo anti APN, pero sí eran protegidas cuando eran incubadas con un anticuerpo anti Caderina. Tanto APN como el receptor tipo caderina han sido descritos como proteínas de unión de las toxinas Cry1A en *B. mori*, lo que permite especular sobre la existencia de otra molécula implicada en el mecanismo de acción de otras proteínas. Este otro receptor involucrado en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1As puede ser la fosfatasa alcalina.

Fosfatasa alcalina

Las fosfatasa alcalinas son hidrolasas responsables de catalizar la remoción de grupos fosfato de muchos tipos de moléculas, incluyendo nucleótidos, proteínas y alcaloides. Las fosfatasa alcalinas son encontradas en todos los animales y están localizadas primariamente en células del epitelio intestinal de los insectos. Se ha propuesto que las fosfatasa alcalinas de insectos participan en la absorción de metabolitos y procesos de transporte (Eguchi, 1995).

El papel de las fosfatasa alcalinas como receptores de las toxinas Cry es un campo que recientemente se está explorando. Por lo tanto, los trabajos concernientes al papel de las fosfatasa alcalinas como receptores son muy limitados, en comparación con los correspondientes a APN y el receptor tipo caderina. Sin embargo, resultados preliminares sugieren que ALP puede actuar como receptor en algunos lepidópteros y dípteros.

Las fosfatasa alcalinas de los lepidópteros *Manduca sexta* (McNall y Adang, 2003), *Heliothis virescens* (Jurat – Fuentes y Adang, 2004) y *Helicoverpa armigera* unen a la toxina Cry1Ac (Tabla No. 3); también se ha planteado que funcionan como receptores de las toxinas: Cry1Ab en *M. sexta* (Arenas *et al.*, 2010), Cry1B en el coleóptero *Anthonomous grandis* (Martins *et al.*, 2010), y en el díptero *Aedes aegypti* de las toxinas, Cry4Ba (Dechklar *et al.*, 2011), Cry11Aa (Fernández – Luna *et al.*, 2009) y Cry11Ba (Hua *et al.*, 2009). La fosfatasa alcalina recientemente se ha asociado con mecanismos de resistencia a las toxinas Cry1 en organismos seleccionados tanto en el laboratorio como en el campo, en lepidópteros como *Helicoverpa armigera*, *Heliothis virescens* y *Spodoptera frugiperda*, donde se observó que estos organismos resistentes tenían la expresión de transcrito, proteína y actividad enzimática de fosfatasa alcalina disminuida (Jurat-Fuentes *et al.*, 2011).

Arenas *et al.*, (2010) reportaron que la mutante L511A, localizada en el dominio III de la toxina Cry1Ab, está afectada en la unión a la ALP, y su actividad tóxica es severamente disminuida en *M. sexta*. Con este resultado, se demostró por primera vez que la ALP es una proteína que interactúa con la toxina Cry1Ab. Otra aportación importante de Arenas *et al.*, 2010 fue la observación que tanto APN como ALP están interactuando con la toxina Cry1Ab, sugiriendo que ambos pueden funcionar como moléculas receptoras de esta toxina.

Tabla No. 3 Interacción de ALP de los lepidópteros con las toxinas Cry1 de *Bacillus thuringiensis*

	Trabajos realizados <i>in vitro</i>	Trabajos realizados <i>in vivo</i>
<i>Manduca sexta</i>	Cry1Ab Arenas <i>et al.</i> , 2010 Cry1Ac McNall y Adang, 2003	
<i>Heliothis virescens</i>		Cry1Ac Jurat-Fuentes <i>et al.</i> , 2002 Jurat-Fuentes <i>et al.</i> , 2004
<i>Helicoverpa armigera</i>		Cry1Ac Jurat-Fuentes <i>et al.</i> , 2011
<i>Spodoptera frugiperda</i>		Cry1Fa Jurat-Fuentes <i>et al.</i> , 2011

El RNA de interferencia como herramienta para el estudio de la participación de los receptores anclados por GPI en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1As.

El proceso de regulación post - transcripcional mediado por RNAs pequeños es conocido como silenciamiento por RNA o RNA de interferencia (RNAi). Este es un mecanismo altamente conservado en organismos eucariontes multicelulares (Fire *et al.*, 1998). Un aspecto importante de la tecnología de RNAi, es la relativa facilidad de usar en insectos, y en otros invertebrados, cuando se compara con el uso en vertebrados e incluso humanos (Perrimon *et al.*, 2010). Esta condición del RNAi en insectos es conferida por la ausencia de la respuesta de interferón, inducida por RNAs largos de doble cadena, y permite que se pueda introducir RNA de doble cadena con tamaños que pueden variar desde 200 pb hasta 2000 pb; este RNA es específico para un gen, puede ser introducido *in vitro* directamente en las líneas celulares de insectos o inyectado o proporcionado mediante alimentación a los insectos (Huvenne y Smagghe, 2010). Esta herramienta ha sido empleada de forma exitosa en los lepidópteros, *S. litura* y *D. sacharalis*, para estudiar la función de APN en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1Ca y Cry1Ab, respectivamente (Rajagopal *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2010).

Los descubrimientos recientes han revelado los procesos de regulación genética, en los cuales se han identificado muchas familias de RNAs pequeños (que comprenden de 20-30 nucleótidos) que median el silenciamiento de los genes. Estos RNAs pequeños se pueden clasificar en tres grandes grupos de moléculas: RNAs pequeños interferentes, microRNAs y RNAs asociados a Piwi. Estas moléculas pequeñas de RNA llevan a cabo una serie de mecanismos regulatorios, incluyendo los que silencian genes endógenos y los que restringen la expresión de invasores parásitos y patógenos como los transposones y los virus. En el caso de los RNAs pequeños interferentes, el mecanismo básico de acción puede ser dividido en tres pasos (Siomi y Siomi, 2009).

Primero, la respuesta de RNA de interferencia comienza con la presencia de una molécula de RNA de doble cadena (RNAdc) en la célula. Esta molécula es expresada en, o

introducida a la célula, (por ejemplo, como resultado del apareamiento de transcritos sentido y antisentido o la formación de estructuras tallo - asa); la fuente más común del RNA de doble cadena en la célula es la infección por virus que producen RNAdc. Este RNAdc es procesado en dúplex de RNAs pequeños por una ribonucleasa III conocida como *Dicer*.

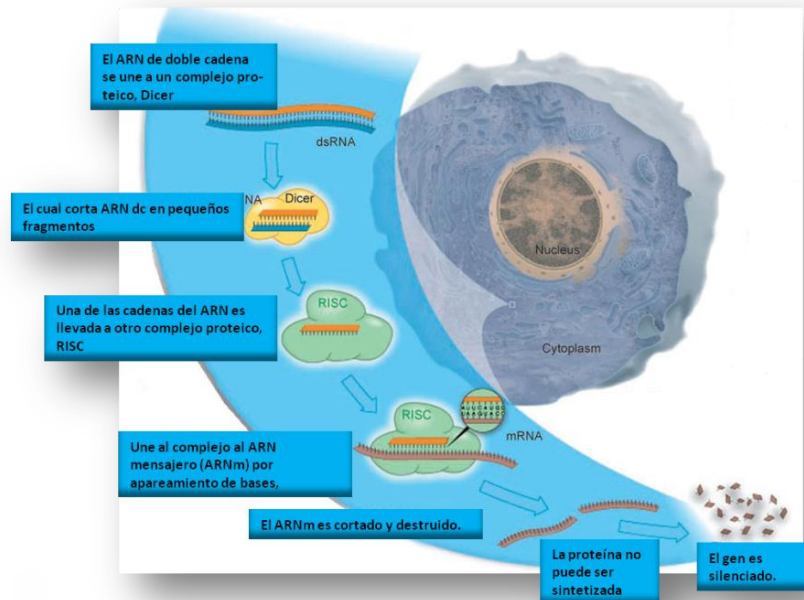


Figura No. 5 Representación esquemática del mecanismo general del RNA de interferencia (modificado de Fire, 2007).

Segundo, estos dúplex son separados, y una cadena es llevada preferencialmente a un complejo proteico conocido como el Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (por sus siglas en inglés: RISC). Tercero, este complejo hibrida en el transcriptoma a los RNAs blancos potenciales. La cadena sencilla de RNA hibridada, llamada la cadena guía, dirige una endonucleasa, que es una proteína de la familia Argonauta, presente en el RISC (Höck y Meister, 2008), a degradar el RNA mensajero que contiene al RNA guía apareado. De esta forma, la cadena guía determina la especificidad de la respuesta al RNAi (Siomi y Siomi, 2009). El resultado final de esta hibridación es la reducción (*knock down*) de la proteína producida por el gen blanco (Figura No. 5).

Una característica importante de la respuesta al RNA de interferencia es la difusión de éste. La absorción del RNAi sucede en muchos organismos (Jose y Hunter 2007), pero ha sido mejor descrita en plantas y en *Caenorhabditis elegans*. Este mecanismo sirve de forma primaria como un mecanismo antiviral (Baulcombe, 2004). En *C. elegans*, el silenciamiento disparado por RNAdc inyectado, ingerido o expresado localmente puede

moverse en todo el organismo para reducir la expresión genética endógena y todas las células no neuronales, incluyendo la línea germinal, por lo tanto transmitiendo el silenciamiento a la siguiente generación (Fire *et al.*, 1998; Timmons y Fire, 1998).

Hipótesis

La aminopeptidasa N1 y la fosfatasa alcalina desempeñan papeles diferenciales *in vivo* en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac.

Objetivo General

Estudiar el papel *in vivo* como receptores de la aminopeptidasa N1 y la fosfatasa alcalina mediante el silenciamiento de los genes que codifican a estas proteínas.

Objetivos Particulares

- 1) Analizar la participación *in vivo* de la aminopeptidasa N1 de *M. sexta* en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac.
- 2) Analizar la participación *in vivo* de la fosfatasa alcalina de *M. sexta* en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac.

Materiales y Métodos

Las cepas, plásmidos, medios de cultivo y soluciones utilizados se encuentran descritos brevemente en la Tabla No. 4 y Tabla No. 5.

Tabla No. 4 Cepas y plásmidos utilizados en este estudio

		Descripción
C E P A S	<i>E. coli</i> Top 10	Empleada para la clonación de las construcciones para el RNAi
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Expresión del plásmido pET22b -ALP
	<i>B. thuringiensis</i> st. 407	Cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i> no productora de cristal.
	<i>B. thuringiensis</i> st. 407 Cry1Aa	Cepa portadora del plásmido pHT409-1Aa que expresa la protoxina Cry1Aa (resistente a eritromicina).
	<i>B. thuringiensis</i> st. 407 Cry1Ab	Cepa portadora del plásmido pHT315-1Ab que expresa la protoxina Cry1Ab (resistente a eritromicina).
	<i>B. thuringiensis</i> st. HD73	Cepa que expresa de forma natural la toxina Cry1Ac. Sin resistencia a antibiótico.
P L Á S M I D O S	pET 22b	Promotor <i>lacZ</i> inducible, para expresar la ALP de <i>M. sexta</i>
	pLitmus 28i	Con el sitio múltiple de clonación flanqueado por los sitios del promotor de la T7 RNA Polimerasa.
	pIZT	Para expresar proteínas en líneas celulares de insectos. Fusión de la proteína de interés con la proteína verde fluorescente.
	pHSP70	Para expresar proteínas en líneas celulares de insectos. Promotor inducible por temperatura.

Tabla No. 5 Medios y soluciones empleados en este estudio

Nombre	Componentes	Especificaciones
Medio HCT	Bacto-triptona 2.5g Casaminoácidos 1.0g Bacto-agar 7.5g	Aforar a 446 mililitros con agua destilada. Después ajustar el pH a 7.5 con KOH. Si se requiere sólido, agregar el agar al final. Esterilizar en autoclave. Una vez frío agregar las soluciones previamente esterilizadas: 1, 2, 3, 4 y glucosa al 10%.
Medio 2X-TY	Triptona 16g Extracto de levadura 10g NaCl 5g	Aforar a un litro con agua destilada. Esterilizar en autoclave.
Medio LB (Luria-Bertani)	Bacto peptona 10g Bacto-extracto de levadura 5g NaCl 10g Bacto-agar 15g	Aforar a 1 litro con agua destilada y ajustar el pH a 7 con NaOH. En caso de requerirse sólido, agregar el agar al final. Esterilizar. Una vez esterilizado, agregar el antibiótico (ampicilina 100µg/ml o eritromicina 10µg/ml).
Soluciones		
Solución 1 HCT Agregar 25mL	KH ₂ PO ₄ 6.8g	Disolver en 100ml de agua destilada.
Solución 2 HCT	MgSO ₄ 7H ₂ O 1.23g MnSO ₄ H ₂ O 0.01619g	Disolver en 100ml de agua destilada.

Agregar 0.5ml	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.14g	
Solución 3 HCT Agregar 5 ml	FeSO ₄ ·7H ₂ O H ₂ SO ₄ 1N	0.2g 10ml	Disolver en 100ml de agua destilada.
Solución 4 HCT Agrega 5ml	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.47g	Disolver en 100ml de agua destilada.
Glucosa al 10% HCT Agregar 15ml	C ₆ H ₁₂ O ₆	10g	Disolver en 100ml de agua destilada.

Purificación de VMMA de *M. sexta*

Las vesículas de la microvellosidad media apical (VMMA) se obtuvieron por precipitación diferencial con MgCl₂. Se disectó el intestino medio de larvas de los cinco estadios de desarrollo de *M. sexta* y se diluyeron en una relación 1:10 peso/volumen, en la solución I pH 7.4 a 4°C (Manitol 300 mM, Tris-HCl 17 mM, EGTA 5 mM, DTT 2 mM, HEPES 10 mM, EDTA 1mM, PMSF 0.5mM). El tejido se disgregó con un homogenizador de vidrio manteniéndolo en hielo. Una vez homogenizado, se adicionó suavemente 1 volumen de MgCl₂ 24 mM, quedando en una concentración final de 12 mM, se agitó suavemente y se mantuvo en hielo por 15 minutos. Después se centrifugó a 4,500 rpm durante 15 min a 4°C en un rotor Beckman JA-20, el sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 16'000 rpm durante 30 minutos a 4°C en el mismo rotor. La pastilla obtenida se resuspendió en medio volumen de la solución I y medio volumen de MgCl₂ 24 mM. Se repitieron los dos pasos de centrifugación descritos y la pastilla finalmente se resuspendió en la solución I diluida con H₂O en una proporción 1:1 (Wolfsberger, 1993).

Purificación de los cristales de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac

Las cepas de *Bacillus thuringiensis* que expresan a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac, se crecieron en cajas Petri con medio LB sólido durante 12 horas a 30°C suplementado con el antibiótico eritromicina (10 µg/mL). Posteriormente, se inoculó el medio de esporulación HCT líquido, con eritromicina (10 µg/mL). El crecimiento se realizó a 30°C con agitación de 250 rpm durante 72 horas aproximadamente, hasta observar en el microscopio los cristales correspondientes.

La pastilla celular, que contiene la mezcla de esporas – cristales, fue recuperada mediante centrifugación a 10'000 rpm durante 15 minutos. Esta pastilla es lavada tres veces con solución de lavado NE (NaCl 5M, EDTA 0.5 M pH 8) centrifugando a 10'000 rpm durante 15 minutos entre cada lavado. Posteriormente la pastilla es lavada tres veces más con una solución de PMSF 1 mM, y se centrifugó a 10'000 rpm durante 15 minutos. La pastilla fue resuspendida en solución TTN (NaCl 10mM, Tris-HCl 50 mM y Tritón X-100 0.01% pH 7.2).

Posteriormente la mezcla de espora – cristal fue sonicada para separar los cristales de los esporangios mediante gradientes de sacarosa.

Los cristales se purificaron mediante un gradiente de sacarosa de: 84%, 79%, 72% y 67%, cada concentración fue complementada con amortiguador TTN. Las soluciones de mayor concentración fueron colocadas en el fondo del tubo y al último se agregaron las muestras de espora cristal. Los gradientes son centrifugados a 23'000 rpm durante 30 minutos a 15°C en la ultracentrífuga L-80 (Beckman). Las fracciones que contienen los cristales se identificaron mediante observación al microscopio, se colectaron por separado y se lavaron tres veces con agua mili-Q más PMSF 1mM, para eliminar el exceso de sacarosa. Se centrifugó a 10'000 rpm durante 15 minutos (Thomas y Ellar, 1983). Finalmente, los cristales se resuspendieron en 1 mL de PMSF 1 mM, se transfieren a tubos eppendorf y se almacenaron a 4°C.

Solubilización y tripsinización de la toxina

Los cristales fueron solubilizados en amortiguador de carbonatos, 50mM Na₂CO₃ – NaHCO₃ pH 10.5, complementado con 0.02% de β – mercaptoetanol, durante dos horas a 37°C, con agitación constante de 800 rpm. Las protoxinas solubilizadas fueron centrifugadas por 10 minutos a 14'000 rpm para remover el material insoluble, y fueron almacenadas a 4°C hasta su uso. La concentración proteica de las protoxinas y toxinas fue determinada por el método de Bradford usando BSA como estándar.

El procesamiento proteolítico fue realizado *in vitro*, el pH es ajustado a 8.5 mediante la adición de Tris-HCl 1M pH 8.0, en una relación 1:4 (Tris-Protoxina, vol/vol). Se agregó tripsina (Sigma) en una relación masa de 1:30 (tripsina:protoxina). Esta reacción fue incubada a 37°C durante una hora, transcurrido este tiempo, ésta se detuvo con la adición del inhibidor PMSF, cuya concentración final es de 1mM. Posterior a la digestión, las muestras fueron ultracentrifugadas a 90'000 rpm para eliminar los productos de precipitación de la digestión. Los sobrenadantes obtenidos fueron analizados en geles SDS – PAGE al 10% y fueron almacenados hasta su uso.

Para realizar los ensayos de unión al ligando, las toxinas fueron marcadas con biotina utilizando Biotinil-N-hidroxisuccinamida de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Amersham Bioscience); el exceso de biotina fue retirado mediante una columna de Sephadex G25 (Sigma).

Experimento de unión a ligando o *ligand blot*

Se separaron 5 µg de proteína total de VMMA's purificadas en un gel de acrilamida al 9%. Las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (Millipore). La membrana se lavó con PBST (PBS1x, Tween-20 0.1%), y se bloqueó durante 1 hora con BSA 0.2% en PBST. Posteriormente la membrana se lavó con PBST, y se incubó por 2 horas con la toxina Cry1A biotinilada. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la membrana se lavó nuevamente y se incubó con estreptavidina acoplada a peroxidasa por 1 hora. Finalmente, la unión de la toxina fue verificada mediante quimioluminiscencia (Pierce).

Western blot* de las proteínas del intestino de larvas de *M. sexta

El tejido fue lavado, para retirar los restos de comida, en una solución fría de PBS1X 2mM PMSF y resuspendido en 20 µL de esta misma solución; el tejido fue dissociado mediante una sonicación suave del 30% con el Ultrasonic Processor VCX 130PB. Posteriormente, esta solución fue centrifugada a 10'000 rpm durante 5 minutos a 4°C con el rotor F45-30-11 (Eppendorf). La concentración proteica fue cuantificada por el método de Lowry. Estos extractos de proteína total fueron separados en SDS – PAGE 10% y transferidos en membranas PVDF (Millipore). Las proteínas fueron detectadas con anticuerpos policlonales (1:10000) con un anticuerpo secundario anti conejo acoplado con la HRP (Zymed) (1/10000), seguido por el sustrato quimioluminiscente (Pierce) como se indica por el fabricante.

Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína de las VMMA's fue determinada mediante el método de Lowry (BioRad), mientras que la concentración de las protoxinas y toxinas fue determinada por el método de Bradford (BioRad). Con ambos métodos se tomó como referencia una curva estándar de BSA (Bradford, 1976).

Método de Lowry

Se preparó una mezcla de la solución A y la solución S del sistema DC protein- dye (BioRad) (1 mL de solución A y 20 µL de solución S). Se tomaron 5 µL de muestra y se agregaron 125 µL de la mezcla preparada anteriormente, se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente, se adicionó 1 mL de la solución B y se incubó durante 15 minutos. La absorbancia de las muestras se midió a 750 nm y los datos obtenidos fueron referenciados empleando una curva estándar de BSA.

Método de Bradford

La cuantificación de la proteína se realizó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Se tomaron 10 μ L de la muestra, y se aforó con agua a un volumen de 800 μ L. Esta solución fue mezclada por pipeteo, y se agregaron 200 μ L de solución de Bradford (BioRad). Esta mezcla fue incubada durante 5 minutos y se procedió a realizar la lectura de la absorbancia. Al mismo tiempo, se preparó una curva estándar de referencia de BSA.

Obtención de la secuencia codificante de la fosfatasa alcalina de *M. sexta*

RNA total del intestino medio de larvas de segundo estadio de desarrollo de *M. sexta*, fue extraído mediante el kit RNaeasy (Qiagen). Las regiones 5' y 3' del gene fueron obtenidas mediante el método de Amplificación Rápida de Extremos de DNAc (RACE) 5' y 3' con el kit GeneRacer (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los primers fueron diseñados con base a una secuencia EST (Expressed sequence tag) de la fosfatasa alcalina extraída del intestino medio de la larva: esta secuencia EST fue generada mediante pirosecuenciación (No de acceso GenBank GR922057.1). La secuencia obtenida de este PCR tuvo un tamaño aproximado de 1600 pb. Posteriormente fue clonada en un vector TOPO (Invitrogen) y transformada en las células de *E. coli* TOP10 (Invitrogen). Los plásmidos de las transformantes fueron purificados y secuenciados en la Unidad de Secuenciación del IBT – UNAM.

Expresión heteróloga de la fosfatasa alcalina de *M. sexta*

La expresión heteróloga de la fosfatasa alcalina de *M. sexta* fue realizada en el vector pET22b dentro de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). Las transformantes fueron crecidas en un cultivo de 5 ml durante 12 horas, en agitación constante a 37°C, en medio LB suplementado con 50 μ g/ml de ampicilina. Al día siguiente 100 μ L de este cultivo fueron utilizados para inocular a 100 ml de medio 2xYT suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina. Este cultivo fue incubado en agitación constante a 37°C, hasta alcanzar densidad óptica de 0.7 medida a 600nm, donde fue inducida la expresión de la fosfatasa alcalina recombinante con 1mM de isopropil-D-tiogalactopiranosido (IPTG; Sigma) por 5 horas en agitación constante a 30°C. Después de este tiempo, 200 μ L del cultivo fueron removidos y mezclados con buffer de cargado de Laemmli (Laemmli, 1970). En un gel de SDS – PAGE al 12% se analizaron 15 μ l de esta mezcla, para confirmar la expresión de la proteína recombinante; este gel se tiñó mediante Azul de Coomassie.

Para obtener la fosfatasa alcalina recombinante, las células fueron empastilladas mediante centrifugación a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C, y la pastilla fue resuspendida en amortiguador STE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 8 M urea [pH8]). Después de la sonicación de 5 minutos en hielo, el desecho celular fue eliminado mediante

centrifugación a 70'000 rpm por 30 minutos a 15°C, y el sobrenadante fue utilizado para purificar por cromatografía de afinidad mediante columnas de Ni – agarosa (Qiagen). Después de un lavado con 35 mM de imidazol en el amortiguador PBS (pH 7.5), la proteína recombinante fue eluida con 250mM de imidazol, y gradualmente dializada con el buffer PBS. Las proteínas purificadas fueron analizadas en geles SDS – PAGE al 12%, y la concentración proteica fue determinada mediante el método de Bradford.

Análisis de las afinidades de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac mediante Resonancia Superficial de Plasmones

La fosfatasa alcalina de *M. sexta* purificada de *E. coli* fue inmovilizada en un sensor COOH (ICX Nomadix) mediante el método convencional de aminas. El amortiguador de corrida para todos los experimentos fue el amortiguador HBS (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, y 0.005% (vol/vol) Tween 20, pH 7.4), el cual fue filtrado (con un filtro de 0.22 µm) y desgasificado. Se utilizaron diluciones seriadas que comprenden a 0, 20, 40, 60, 80 y 100 nM de cada una de las toxinas, Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac; estas diluciones fueron inyectadas en orden aleatorio, y la superficie del chip fue regenerada después con una inyección de 20 mM de NaOH.

El análisis de afinidad de las toxinas Cry1As por la fosfatasa alcalina recombinante fue llevada a cabo en un instrumento SensiQ (ICX Nomadix), el cual fue programado para realizar experimentos de resonancia superficial de plasmones (SPR) y análisis cinético. El sensograma fue registrado como una gráfica de respuesta de unión (unidad de resonancia) contra tiempo. Todos los sensogramas fueron procesados tomando en cuenta el método de doble referencia, para eliminar unión no específica de la contribución de fondo y artefactos del amortiguador, mediante la substracción de señales de inyección de la celda de flujo de referencia y del buffer blanco. Los datos obtenidos para todas las uniones de las proteínas fueron analizados y adaptados 1:1 a la unión de Langmuir, y las constantes de unión fueron calculadas utilizando el software SensiQ, versión B. 02, de ICX Nomadix.

Alineamiento de las Aminopeptidasas N de *M. sexta* y las Fosfatasas alcalinas de los lepidópteros

Las isoformas de APNs de *M. sexta*: APN1 (No. de acceso GenBank AF123313.1), APN2 (No. de acceso GenBank X978777.2), APN3 (No. de acceso GenBank AF498996.1) y APN4 (No. de acceso GenBank AY095259) se alinearon con el programa Clustal W2, para identificar las regiones con menor identidad entre ellas.

La secuencia de ALP de *M. sexta* obtenida en este estudio, fue analizada y alineada con las fosfatasas alcalinas conocidas de otros insectos lepidópteros, como *B. mori* (No. de acceso GenBank AB013386.1), *H. armigera* (No. de acceso GenBank. ACF40807.1), *H. virescens* (No. de acceso GenBank FJ416470.1), y *T. ni* (No. de acceso GenBank EG79734.1) con el programa Clustal W2.

Clonación en LITMUS28i

Se diseñaron *primers* para las regiones de APN1 identificadas después del alineamiento de las isoformas de APNs de *M. sexta* y la región 5' del EST de ALP (Tabla No. 6). Los productos de PCR fueron digeridos y clonados en el vector pLitmus 28i (New England Biolabs).

Los *primers* y las secuencias correspondientes a las clonaciones fueron realizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de Instituto de Biotecnología – UNAM.

Tabla No.6 *Primers* diseñados para amplificar las regiones para silenciar la expresión de APN1 y ALP, los sitios subrayados denotan los sitios de restricción para clonar en el vector pLitmus28i.

	Primer Fw (5' - 3')	Primer Rv (5' - 3')
1a. Región APN1	cgc cct <u>tct cga</u> ggg cgt tct t	gta ggg cat <u>tct aga</u> cgt aaa agt ttg tcc
2a Región APN1	cga caa <u>ctc gag</u> gtc gcc gaa ccc tac cac	gtc aat gac <u>tct aga</u> ctg tcc agt cat aac
3a. Región APN1	cag gcc agc <u>ctc gag</u> aag ttc ttg aac gct	gtt cac gcc agt <u>tct aga</u> ggc agc gcc gat
ALP	gtt gtt <u>caa gct</u> tct ggc ctg cgc gat cgc gac ggc aga gga tgt	cgg tcc <u>atc tag</u> atg act cgg tac tta gtc ttc act cca gtc aag

Preparación de células de *E. coli* Químico competentes

Se inocularon 5 ml de medio LB líquido, con una colonia de la cepa de *E. coli* TOP10, y se dejó crecer durante 12 horas a 37°C. Posteriormente se inocularon 100 ml de LB líquido con 2 ml del pre-cultivo. Este cultivo se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar una D. O. _{600nm} de 0.4. El matraz se colocó en hielo durante 5 minutos. Las células fueron recuperadas mediante centrifugación a 3'000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante es desechado y la pastilla se resuspendió en un volumen de 10 ml de una solución fría de CaCl₂ 60 mM, Glicerol 15%. Esta suspensión fue incubada durante 30 minutos en hielo. Posteriormente las células fueron centrifugadas a 3'000 rpm durante

10 minutos. El sobrenadante es descartado y la pastilla celular es resuspendida en 2 ml de CaCl₂ 60 mM, Glicerol 15%. Las células fueron separadas en alícuotas con un volumen de 200 µl. Estas células fueron empleadas inmediatamente o fueron almacenadas a -70°C.

Transformación por choque térmico

Las células competentes se descongelaron en hielo y se les añadió la ligación del vector pLitmus con los insertos. Esta mezcla se incubó durante 30 minutos en hielo; después de este tiempo, se aplicó un choque térmico de 42°C durante 2 minutos. Posteriormente, se incubaron en hielo durante 5 minutos y se les agregó 800 µl de LB líquido sin antibiótico. Las células se dejaron recuperar a 37°C en agitación durante una hora. El volumen de las células que fue esparcido en las placas de LB-Ampicilina (200 µg/ml) sólido fue de 100 a 200 µL, y fueron incubadas a 37°C durante 12 horas. Colonias diferentes fueron inoculadas en 1 ml de LB-Ampicilina y se incubaron por 4 horas para hacer PCRs de colonia e identificar aquellas que contengan el inserto deseado.

Transcripción *in vitro*

El RNAdc fue sintetizado *in vitro* con el sistema TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Fermentas). El templado para llevar a cabo la transcripción *in vitro* fue un producto de PCR proveniente del vector pLitmus28i con las diferentes construcciones de ALP, APN1 o Bt-R1, amplificado con los *primers* T7, cuya concentración fue de 1 µg y se siguieron las indicaciones sugeridas por el fabricante. El RNAdc fue extraído con fenol:cloroformo. Posteriormente, el RNAdc fue cuantificado en un Nanodrop 2000 (ThermoScientific).

Interferencia de APN1, ALP y Bt-R1

Larvas neonatas de *M. sexta* fueron sometidas a un ayuno de 2 a 3 horas, transcurrido ese lapso fueron alimentadas con un 1 µL de RNAdc a una concentración de 4 µg. Después, se incorporaron a su dieta regular por 12 horas, para luego ser retadas con toxina ó ser analizadas. En el caso del análisis de la eficiencia del silenciamiento, las larvas fueron alimentadas con RNAdc y crecieron hasta llegar hasta el tercer estadio de desarrollo (aproximadamente 7 días).

RT-PCR cuantitativo y cualitativo

El RNA total de intestinos de larvas de *M. sexta* fue purificado mediante el paquete comercial RNAeasy minikit (Qiagen). La concentración de RNA de las muestras individuales, intestinos de *M. sexta*, se cuantificó para después realizar la síntesis individual de DNAC. Cada reacción de síntesis se llevó a cabo con una concentración de 500 ng de RNA total como templado. El DNAC se obtuvo con el sistema Super Script III First Strand Synthesis System (Invitrogen).

Se diseñaron *primers* específicos para esta reacción (Tabla No. 7). Tanto para APN1 como para ALP y para el control (la proteína ribosomal S3 No. de acceso U12708.1), se usaron las siguientes condiciones: 30s at 95°C, seguido por 40 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 60°C y 30 s a 72°C, y finalmente 95°C durante 5 s, seguido de 1 min a 65°C. Para validar los resultados de estos experimentos, se realizaron 3 réplicas de cinco muestras independientes provenientes de los diferentes tratamientos. El PCR en tiempo real fue llevado a cabo en el LightCycler 480 (Roche) usando el sistema de detección de Sybr Green (Fermentas).

Se diseñaron *primers* específicos para amplificar las isoformas 2, 3 y 4 de aminopeptidasa N de *M. sexta* para realizar reacciones de RT – PCR cualitativo. Las reacciones se realizaron con la polimerasa *Taq*, con las siguientes condiciones: un ciclo de 95° durante 5 minutos, 30 ciclos de 95°C 30s, 62°C 30s, 72°C 30s, y un ciclo de extensión a 72°C por 10 minutos. Estos productos fueron analizados en geles de agarosa al 1%.

Tabla No. 7 *Primers* diseñados para las reacciones de RT-PCR cuantitativo y cualitativo.

		Primer Fw (5' - 3')	Primer Rv (5' - 3')
RT - PCR cuantitativo	APN1	cga caa ctc gag gtc gcc gaa ccc tac cac	cat ctt gcc tga acg aga gtc ata cgg ccg
	ALP	gtt gtt caa gct tct ggc ctg cgc gat cgc gac ggc aga gga tgt	ttt ctc ctg gag ctt ggc gtt cag cgc tgc
	RPS3	gtg tca ccc cta ccc gat cgg aga tca tca	atc tca aag act cgg cct gag cga tgg cgc
RT - PCR cualitativo	APN2	ggt ctc gag ctg agc acc aac gaa gac agc act aga aac c	act tct aga cca ttc tcc tca taa gta gaa acg tag acg cc
	APN3	atc ctc gag atg ttg ctc ccc act ata cta tgt gtc ctc	gta tct aga gcc tct ata gaa tcc tct gtc aag agg g
	APN4	cag ctc gag gac gac aaa tct tcg ctt tgg cat gcg ttc t	ctc tct aga tcg taa ata cca tac atg tca gtg cgc ata

Bioensayos con las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac

Los bioensayos se llevaron a cabo, con larvas de *M. sexta* alimentadas con RNAdc, mediante el método de contaminación de superficie. Las concentraciones de las toxinas Cry1As fueron determinadas por el método de Bradford. Una dilución de 25ng/cm² de espora cristal de la toxina Cry1Aa, Cry1Ab o de Cry1Ac, en un volumen de 35 µL, fue agregada a la superficie de la dieta, que está dispuesta en cajas de 24 pozos, y se permitió secar. Cuando la dieta estuvo seca, se colocó una larva en cada pozo. La mortalidad se monitoreó después de 5 días. Cada bioensayo se realizó por triplicado y para dar validez al resultado cada experimento se realizó al menos tres veces. Los resultados obtenidos se compararon con el control negativo, donde en lugar de toxina se adicionó agua sobre la superficie de la dieta.

La dosis letal media (LC₅₀) de las toxinas Cry1A fue determinada después de retar a larvas de *M. sexta* neonatas con estas toxinas. Se emplearon 5 dosis de toxina: 5, 10, 25, 50 y 250 ng/cm². La mortalidad fue registrada, y la LC₅₀ fue calculada mediante un análisis Probit con el software POLO Plus (Leora).

Clonación del receptor tipo caderina, aminopeptidasa N1 y fosfatasa alcalina para expresión en líneas celulares

Se diseñaron primers específicos para realizar la clonación de Bt-R1, aminopeptidasa N1 y fosfatasa alcalina de *M. sexta* en los vectores pIZT (Invitrogen) y pHsp70 (Tabla No. 6).

El RNA total de *M. sexta* fue aislado como se ha descrito. La síntesis de DNAc se realizó con 5 µg de RNA. Las condiciones para realizar los PCRs y obtener las secuencias de estos receptores fueron las siguientes: en el caso del receptor tipo caderina se utilizó la polimerasa *Pfx* platinum (Invitrogen) con las condiciones que sugiere el fabricante, 98°C durante 3 minutos, posteriormente 25 ciclos de 98°C 30 s y 68°C 2:30 minutos. Las reacciones de APN1 y ALP se realizaron con la polimerasa Pfu (Fermentas), cuyas condiciones fueron, 95° durante 5 minutos (1 ciclo), 25 ó 30 ciclos (APN1 o ALP, respectivamente) 95°C 30s, 62°C 30s, 72°C 3 minutos ó 1:30 minutos (APN1 o ALP, respectivamente) y un ciclo de extensión a 72°C por 10 minutos. Estos productos fueron analizados en geles de agarosa al 1%, y fueron digeridos de forma secuencial con las enzimas *KpnI* y *NotI*, en el caso de Bt-R1 y APN1, y ALP con las enzimas *EcoRI* y *XbaI*. Los plásmidos fueron digeridos con esas enzimas, para llevar a cabo la clonación. Las clonas positivas fueron secuenciadas en la Unidad de Secuenciación del IBT – UNAM.

Tabla No. 8 *Primers* diseñados para clonar a los receptores en los vectores de expresión de líneas celulares de insecto. Los sitios subrayados denotan los sitios de restricción para clonar en el vector pIZT y pHSP70. Las enzimas empleadas para clonar BtR1 y APN1 fueron *KpnI* y *NotI*, mientras que para ALP fueron *EcoRI* y *XbaI*.

	Primer Fw 5' <i>KpnI</i> o <i>EcoRI</i>	Primer Rv 3' <i>NotI</i> o <i>XbaI</i>
BtR1	agc ccc <u>ggt acc</u> tgt gag atg gca gtt gac gtc cga atc gct gcc	aac tag tgt <u>tgc ggc cgc</u> cta gat ctt tct gaa ctg tcc gtt aac gaa ctc
APN1	gaa ttc <u>ggt acc</u> aga atg gtg aat ctc ggg ttt acc att ttc ttg	aaa ata cgc <u>tgc ggc cgc</u> tta cgc tac cat gtt aat ggc aag tgt gac gag
ALP	atg aat tcc atg ttt atc ggc gat ggc atg tcg	<u>att cta gag</u> ggg tgt tgg tca tca gtc agg c

Resultados

Actividad biológica de las toxinas Cry1As en el lepidóptero *M. sexta*

Las toxinas Cry1 presentan actividad insecticida contra diferentes lepidópteros; en el caso de *Manduca sexta*, se ha reportado su susceptibilidad a diferentes toxinas Cry1 (Muñoz-Garay et al., 2006). Un análisis de las secuencias de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac indica que las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac comparten un 99% de identidad en el dominio II (rectángulos blancos, Figura No. 6a), mientras ambas comparten una identidad de 69% con este dominio de la toxina Cry1Aa (recuadro cyan, Figura No. 6a), donde las regiones más variables son las asas. En contraste, las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab comparten un dominio III muy similar con 98% de identidad (rectángulos verdes, Figura No. 6a), mientras que el dominio III de la toxina Cry1Ac comparte sólo el 38% de identidad con estas toxinas (rectángulo blanco, Figura No. 6a). Después de este análisis se comparó la actividad tóxica en las larvas de *M. sexta* y se pudo observar que a pesar de las diferencias entre las secuencias de sus dominios II y III, su toxicidad es muy similar (Figura No. 6b), por lo que se continuó el análisis comparando las uniones a los receptores que se han descrito.

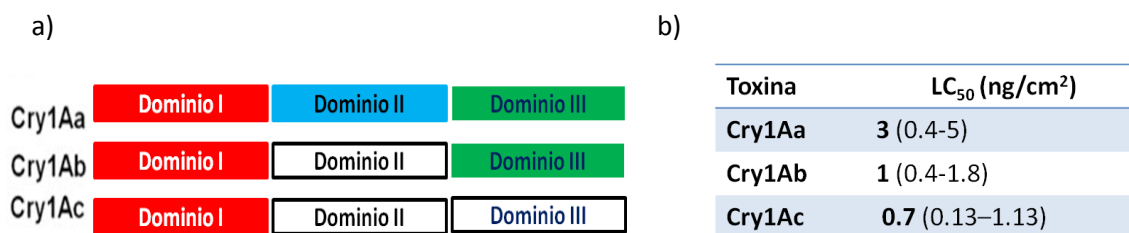


Figura No. 6 Diferencias estructurales y de actividad de las toxinas Cry1As. a) Representación esquemática de la localización de la variabilidad entre estas toxinas. b) Actividad tóxica de estas proteínas en nuestro organismo de estudio *M. sexta*.

Expresión de Aminopeptidasa N1, Fosfatasa Alcalina y receptor tipo Caderina en el desarrollo larvario del lepidóptero *M. sexta*

Previamente un estudio del laboratorio con la toxina Cry1Ab indicó que ésta se une diferencialmente a los receptores aminopeptidasa y fosfatasa alcalina, por lo que decidimos ampliar este análisis con las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac.

El primer experimento fue un *Western blot* para determinar si durante los 5 estadios de desarrollo larvario de *M. sexta* están presentes y en qué niveles los receptores fosfatasa alcalina, aminopeptidasa y caderina (Figura No. 7).

Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de estos receptores es diferencial: la fosfatasa alcalina (65kDa) se expresa durante el desarrollo de nuestro organismo de estudio (Figura No. 7a); mientras que APN1 (120 kDa) se expresa en forma creciente en el desarrollo de este organismo (Figura No. 7b). El receptor tipo caderina (210 kDa) fue empleado como control en este experimento. La expresión de esta proteína es creciente durante el desarrollo larvario de *M. sexta* (Figura No. 7c), este resultado correlaciona con lo observado por Midboe *et al.*, 2003. Estas tres proteínas, ALP, APN1 y receptor tipo Caderina, se expresan a lo largo del desarrollo de *M. sexta*.

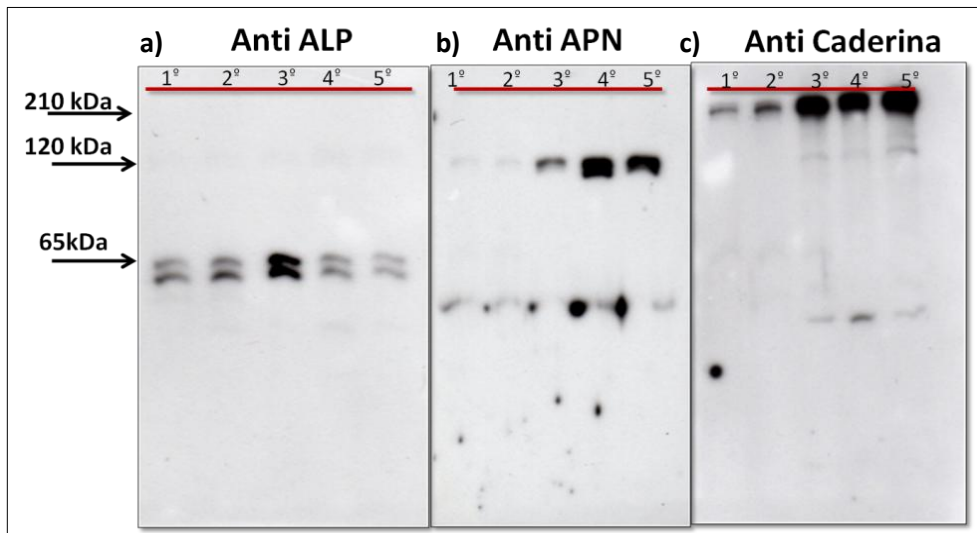


Figura No. 7 Análisis, por *Western blot*, de la expresión de ALP, APN1 y el receptor tipo Caderina en las vesículas de membrana de la microvellosidad apical durante los cinco estadios larvarios de *M. sexta*. a) ALP, b) APN1, c) Receptor tipo Caderina.

La correlación entre la expresión proteica de estos receptores y la presencia de sus transcritos se analizó mediante un experimento de RT-PCR (Figura No. 8). Los transcritos de APN1 (Figura No. 8a) y ALP (Figura No. 8b) se encuentran expresados continuamente del primero al quinto estadio de desarrollo de *M. sexta*. El control de referencia de este experimento fue el transcrito de la proteína ribosomal S3 (*RPS3*) cuya expresión se mantuvo sin cambios durante el desarrollo de *M. sexta* (Figura No. 8c).

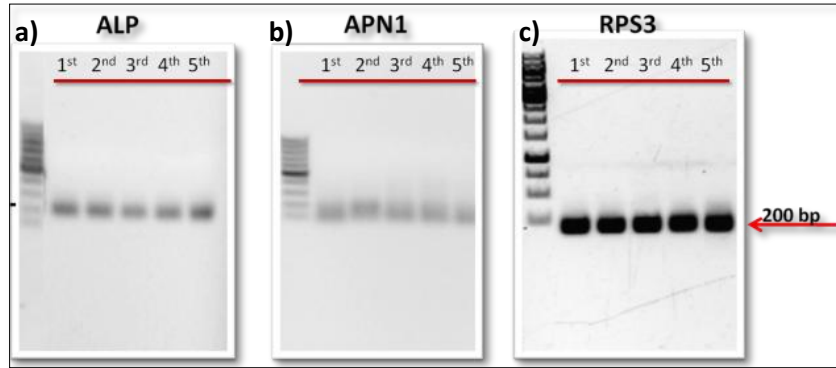


Figura No. 8 Expresión de los transcritos de ALP y APN1 durante el desarrollo larvario de *M. sexta*.

Unión de las toxinas Cry1A con las proteínas de las vesículas de la membranas de la microvellosidad apical del intestino de *M. sexta* durante el desarrollo larvario

La unión de la toxina Cry1Ab a las proteínas de las VMMA a lo largo del desarrollo larvario de *M. sexta* fue analizada por Arenas *et al.*, 2010, pero la información correspondiente a esta unión de las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac no había sido analizada.

Para determinar la unión de las toxinas Cry1A a las proteínas de las VMMA se realizaron ensayos de unión de ligando con las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac marcadas con biotina. En la Figura No. 9a se observa que la toxina Cry1Aa une preferencialmente en el primer y tercer estadio de desarrollo a ALP (65kDa), y une a APN (120 kDa) a partir del tercer estadio de desarrollo; este mismo efecto se observó para la toxina Cry1Ab, se une preferencialmente a ALP en el primer y tercer estadio de desarrollo; en cambio, la unión APN se detecta a partir del tercer estadio de desarrollo (Figura No. 9b), correlacionando con lo reportado por Arenas *et al.*, 2010. Finalmente, la unión de la toxina Cry1Ac es diferente, pues une solamente a APN (Figura No. 9c). Al respecto, es importante recordar que ambos receptores anclados por GPI están expresados diferencialmente a lo largo del desarrollo larvario de *M. sexta*, pero están presentes durante todo el ciclo larvario de este organismo.

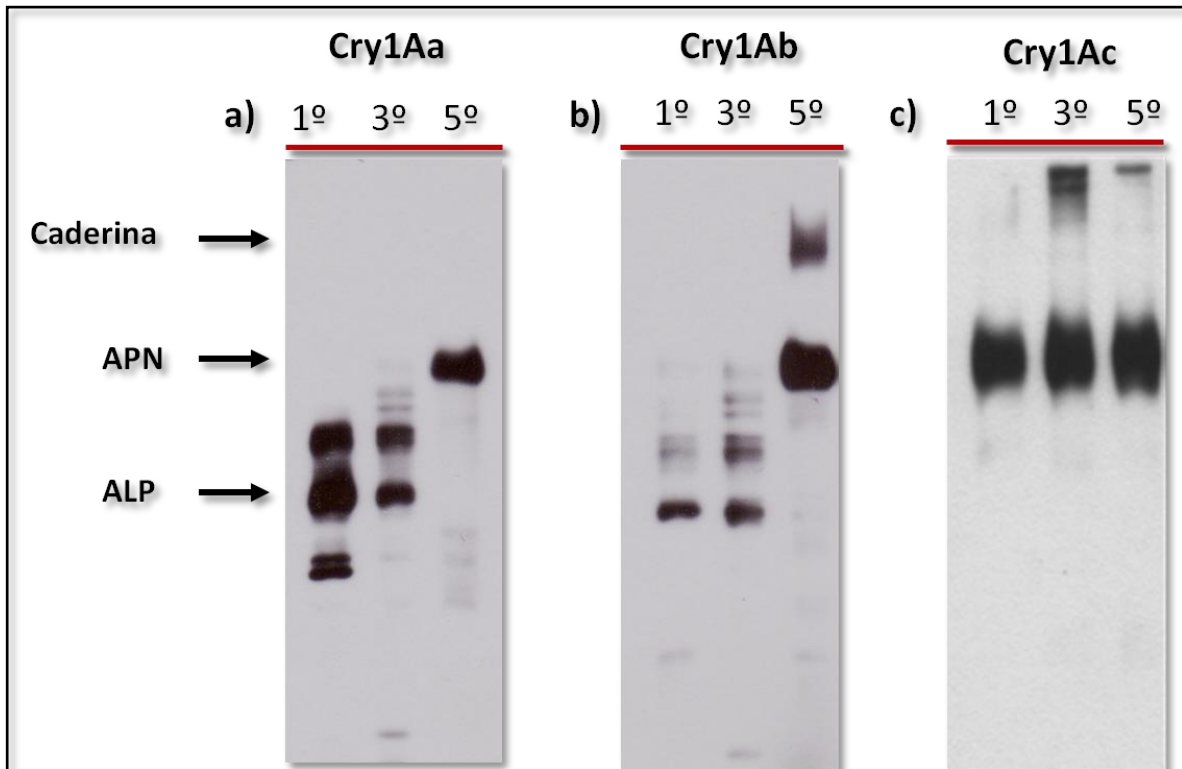


Figura No. 9 Unión de las toxinas Cry1As marcadas con biotina a las proteínas de las vesículas de membrana de la microvellosidad de 1º, 3º y 5º estadio del desarrollo larvario de *M. sexta*. a) Toxina Cry1Aa, b) Toxina Cry1Ab, c) Toxina Cry1Ac.

La fosfatasa alcalina de *M. sexta* como proteína de unión de las toxinas Cry1A

a) Obtención de la secuencia nucleotídica de la fosfatasa alcalina de *M. sexta*

La función de la fosfatasa alcalina de *M. sexta* como proteína de unión de las toxinas Cry ha comenzado a estudiarse y caracterizarse recientemente; se han reportado algunas secuencias fosfatasas alcalinas de otros lepidópteros, como *B. mori* (Itoh *et al.*, 2003), *H. armigera* (Ning *et al.*, 2010), *H. virescens* (Perera *et al.*, 2009) y *T. ni* (Baxter *et al.*, 2011). Sin embargo, la fosfatasa alcalina de *M. sexta* no se había reportado, y a la fecha sólo se cuenta con un banco de secuencias de expresión (EST) realizado por Pauchet *et al.*, 2010. Por lo tanto, en este estudio se realizaron esfuerzos para obtener la secuencia nucleotídica codificante completa de la fosfatasa alcalina de *M. sexta*. La secuencia de expresión disponible de la fosfatasa alcalina se localiza en el extremo 5', y con base en esta secuencia se diseñaron *primers* para obtener la secuencia codificante faltante de esta proteína.

La secuencia codificante de fosfatasa alcalina de *M. sexta* fue resuelta por 5' RACE (Amplificación Rápida de Extremos de DNAC) a partir de una muestra de DNAC de *M. sexta* de segundo estadio de desarrollo. La clona obtenida muestra un marco abierto de lectura de 1473 nucleótidos, y tiene un peso molecular aproximado de 53.4 kDa, mientras que la secuencia con modificaciones postraduccionales tiene un peso aproximado de 63 kDa.

Los alineamientos de la secuencia obtenida de ALP con las fosfatasas alcalinas conocidas de otros insectos lepidópteros, como *B. mori*, *H. armigera*, *H. virescens*, y *T. ni*, indican que la identidad compartida con la fosfatasa alcalina de *B. mori* es del 56%, mientras que con la de *H. virescens*, es del 54%, y con las fosfatasas alcalinas de *H. armigera* y *T. ni* es del 53%. En este análisis también se observó que la fosfatasa alcalina de *M. sexta* comparte con este grupo de proteínas de estos lepidópteros una serie de firmas aminoacídicas.

Dentro de estas firmas aminoacídicas, se observó que el sitio activo de la fosfatasa alcalina de *M. sexta* se encuentra conservado en el grupo de fosfatasas alcalinas analizadas, al igual que el residuo catalítico S103 (Figura No. 10). Los sitios probables de N-glicosilación y O-glicosilación que fueron predichos con los programas [NetNGlyc 1.0 Server - CBS](#) y NetOGlyc 3.1, respectivamente.

<i>M. sexta</i>	-----MKYLLPTAAAG-----LLLLAAQPAMAMD
<i>H. virescens</i>	MMSLYQCLLAVLCC---AACARAHWFHPAATAGRAAATTRVETSANYVWQDAQAADAR
<i>H. armigera</i>	MVTLPFYVVAVLCG---ATSARAHWLHPAAPA---AASRAETSANYWAQDAQAANAR
<i>T. ni</i>	MRSIVTLLVLVAACG---ALADRYHPAEPAPERAGPAGRASPALLGSHWRAQAQDALKER
<i>B. mori</i>	MSTWWLVVVAAAAAAGLVRAEDRYHPERLAAGEASAATRSAAESEASFVWREAQEAIERR
<i>M. sexta</i>	IG--INSDPNS-----MFIGDGMSLATVMAAATFGQLERGLGEEENVLDFEKFPVCGL
<i>H. virescens</i>	LAQVESVKKAR---NVIMFLGDGMSVPTLAAARTLLGQRQNGTGEETKLHFETFPPTIGL
<i>H. armigera</i>	LERVESVKKAH---NVIMFLGDGMSVPTLAAARTLLGQRQNGTGEETKLHFETFPPTIGL
<i>T. ni</i>	LARPANRNKAR---NVIMFLGDGMSVPTLAAARALLGQRQNGTGEETKLHFETFPPTIGL
<i>B. mori</i>	EREGAGAKQAAGHAKNVVMFLGDGMSVPTLAAARTLLGQRQNGTGEETKLHFETFPPTIGL
<i>M. sexta</i>	ARTYCIDACVADSACTATAYLTGVKTKYGVIGLDGNVTRSSCYSQLHKGNWAPSIGQWAL
<i>H. virescens</i>	VKTYCVDACIADSACTATAYLCGVKNNYGAIGVDATVRRGDCQATSNATHVESIAEWAL
<i>H. armigera</i>	VKTYCVDACIADSACTATAYLCGVKNNYGAIGVDATVRRGDCQAAASNTATHVESIAEWAL
<i>T. ni</i>	SKTYCVNSQVADSACSATAYLCGVKTNQGLLGVDAVQRHNCESSIDTARHVESIAEWAL
<i>B. mori</i>	AKTYCVNAQVPDSSCTATAYLCGVKANQGTGLGVTAAVPRHDCCEASTDVTKRQVIAEWAL
<i>M. sexta</i>	EHGLDVGLVTTTRVTHASAPAGMYAHTSERNWESDQVDPVEECLALG--CRDIAYQLVMNPNP
<i>H. virescens</i>	ADGRDVGIVTTTRITHASAPAGTYAKTANRTWENDGEVVSQMGFADKDCPDIAHQLVHHHPG
<i>H. armigera</i>	ADGRDVGIVTTTRITHASAPAGTYAKTANRTWENDGEVVSQMGFADKDCPDIAHQLVHHHPG
<i>T. ni</i>	ADGRDAGIVTTTRITHASAPAGTYAKTANRTWENDGEVVSQMGFADKDCPDIAHQLVHHHPG
<i>B. mori</i>	ADGRDVGIVTTTRITHASAPAGFAKVANRNWENDNDVKQEGHDVNRCPDIAHQLIKMAPG
<i>M. sexta</i>	RQFKVIMGGRRREFLPN--VTGVAGGAGKRIDGVDLTEMWVHVKQEKNAHQYVTDREVLM
<i>H. virescens</i>	NKFKVILGGRRRAFLPNTVQDDEGSYGRRIDNRDLIKEWEDDKVARNVSHQYVWNREQLM
<i>H. armigera</i>	NKFKVILGGRRRAFLPNTVQDDEGSYGRRIDNRDLIQEWKNDKDSRNVSHQYVWNREQLM
<i>T. ni</i>	NKFKVILGGRRRNFPLPTTVTDEESQAGRRTDGRNLIIEWQODKAARGVSKYVWNVSELL
<i>B. mori</i>	NKFKVILGGRRREFLPTTQVDKEGTRGLRDTGRNLIIEWQNDKESQKVSXYLWNRQELL
<i>M. sexta</i>	KVFNDELPEYLLGLFQNDHMDYHLKAQ--NQPTLEEMA EVAIKMLSRSPNGYFLFVEGG
<i>H. virescens</i>	SLN--DDLPEYMLGLFGSSHMKYHMKSNPQXDPTLAELTEVAIRSLRNEKGFLLFVEGG
<i>H. armigera</i>	NLN--DDLPEYMLGLFESSHMEYHLKSDPQTEPTLAELTEVAIRSLRNEKGFLLFVEGG
<i>T. ni</i>	QLN--DNLPEYLLGLFESNHLQYHMQANLNTEPTLEQLTETAIRMLNRNEKGFLLFVEGG
<i>B. mori</i>	KLA--SSPPDYLLGLFEGSHLQYHLEGDESTEPTLAELTDVAIRVLSRNERGFLLFVEGG
<i>M. sexta</i>	RIDHAHHDNSLAHLALDETVYAKAVKKAKSITDEEDTLIVVSSDHAHTMTVAGYPSRGN
<i>H. virescens</i>	RIDHAHHDNLVELALDETVLEMDKAVATATQLLSEDDSLIVVTADHAHVMTINGYSRGN
<i>H. armigera</i>	RIDHAHHDNLVELALDETVLEMDKAVATATKMLSEDDSLIVVTADHAHVMTINGYSRGN
<i>T. ni</i>	RIDHAHHDNLVELALDETVLEMDKAIKRAVELLSEEDTLIVVTADHAHVMSYNGYSRGN
<i>B. mori</i>	RIDHAHHDNYAHLALDETVIEMDRAVKVATDALKEDSLVVVTADHHTVMSFNGYSPRGT
<i>M. sexta</i>	ILGTVDTAKGGDGKPYTTISYANGKAASISPDGTRVDVTLHDQFVSRDLNYAYPSLVPLD
<i>H. virescens</i>	ILGPSRDLGR--DSMPYMTLSYTNPGPFRPHVNGIRPDVTAEPNFR--LDWESHVDVPLE
<i>H. armigera</i>	ILGPSRDLGR--DRMPYMTLSYTNPGPFRPHVNDIRQNVTAEPNVRT--LDWESHVDVPLV
<i>T. ni</i>	ILGPSRDTDE--NNVPYMTLSYTNPGPFRPHVNGKRSVDVTQENGFGT--LTWKSHVDVPLD
<i>B. mori</i>	VLGTVRSLS--NRMPFMVLSYTNPGPARIQQNGVRPDVTTDANFGA--LRWRHTDTPVPLD
<i>M. sexta</i>	SETHGGDDVAVFARGPHHSMFTGLYEQSLPHLMAYAACIGPGRHACVSAHLPT-----
<i>H. virescens</i>	DETHGGDDVAVFARGPHHSMFTGLYEQSLPHLMAYAACIGPGRHACVSAHLPT-----
<i>H. armigera</i>	DETHGGDDVAVFARGPHHSMFTGLYEQSLPHLMAYAACIGPGRHACVSAHLPS-----
<i>T. ni</i>	SETHGGDDVAVFARGPYHMLFTGLYEQSLPHLMAYAACIGPGLHSCAEDTTSTPEANP
<i>B. mori</i>	SETHGGDDVTVFAWGVHMMFSGLYEQTHVPHRMAWAACMGPRHVCVSAATVPT-----
<i>M. sexta</i>	-----
<i>H. virescens</i>	-----AHFFIALFALFTPILLK---
<i>H. armigera</i>	-----AHFFVALPALFISILLR---
<i>T. ni</i>	PEATTASPTTAEPSAAAPVSATLALFALLTTLTLLH-
<i>B. mori</i>	-----AALLSLLLAFTTLRHQCFI

Figura No. 10 Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de la Fosfatasa Alcalina de *M. sexta* y las fosfatasas alcalinas descritas en otros lepidópteros. El péptido señal para la expresión en la superficie celular está marcado con líneas punteadas. Los sitios posibles de O-glicosilación están denotados con círculos, y los de N-glicosilación están señalados con líneas continuas. El sitio activo de la fosfatasa alcalina está enmarcado en un cuadrado, y el posible residuo catalítico está señalado con una estrella. El sitio que se ha predicho para el ancla de GPI está marcado con un triángulo invertido

b) La fosfatasa alcalina recombinante de *M. sexta* como proteína de unión de las toxinas Cry1A

La secuencia de fosfatasa alcalina de *M. sexta* obtenida en este estudio fue clonada en el vector pET22, expresada en *E. coli* y purificada por afinidad, para analizar su capacidad de unión con las tres toxinas Cry1A mediante ensayos de resonancia superficial de plasmones (SPR). En este análisis se pudo observar que la fosfatasa alcalina recombinante puede unirse a las toxinas Cry1Aa, CryAb, y a la toxina Cry1Ac. Las constantes de afinidad de la fosfatasa alcalina recombinante de *M. sexta* con las tres toxinas CryAs fueron estimadas de los valores obtenidos de la constante de asociación (K_{on}) y la constante de disociación (K_{off}).

Las constantes de afinidad (K_D) de la fosfatasa alcalina recombinante de *M. sexta* con la toxina Cry1Aa y Cry1Ab son similares, de 289nM y 268nM, respectivamente (Figura No. 11 a y b), mientras que la constante de afinidad correspondiente con la toxina Cry1Ac es de 4 μ M, que es 16 veces menor a la observada en las otras dos toxinas Cry1A (Figura No. 11c). Esta unión disminuida de la fosfatasa alcalina con la toxina Cry1Ac puede ser resultado de la falta de glicosilación de esta proteína recombinante, varios reportes han sugerido que esta toxina depende de la presencia de N-acetil galactosamina en el receptor para interactuar (Garczinsky *et al.*, 1991; Masson *et al.*, 1995; Burton *et al.*, 1999; Pardo – López *et al.*, 2006). Sin embargo, es necesario realizar ensayos de unión de la toxina Cry1Ac con la fosfatasa alcalina purificada de *M. sexta* para poder confirmar esta hipótesis.

Los resultados de SPR y de unión de ligando sugieren que existen interacciones diferenciales de las toxinas Cry1As con los receptores anclados por GPI. Estas observaciones dieron la pauta para comenzar los estudios de función *in vivo* de ALP y APN1 como receptores de las toxinas Cry1As, mediante RNA de interferencia.

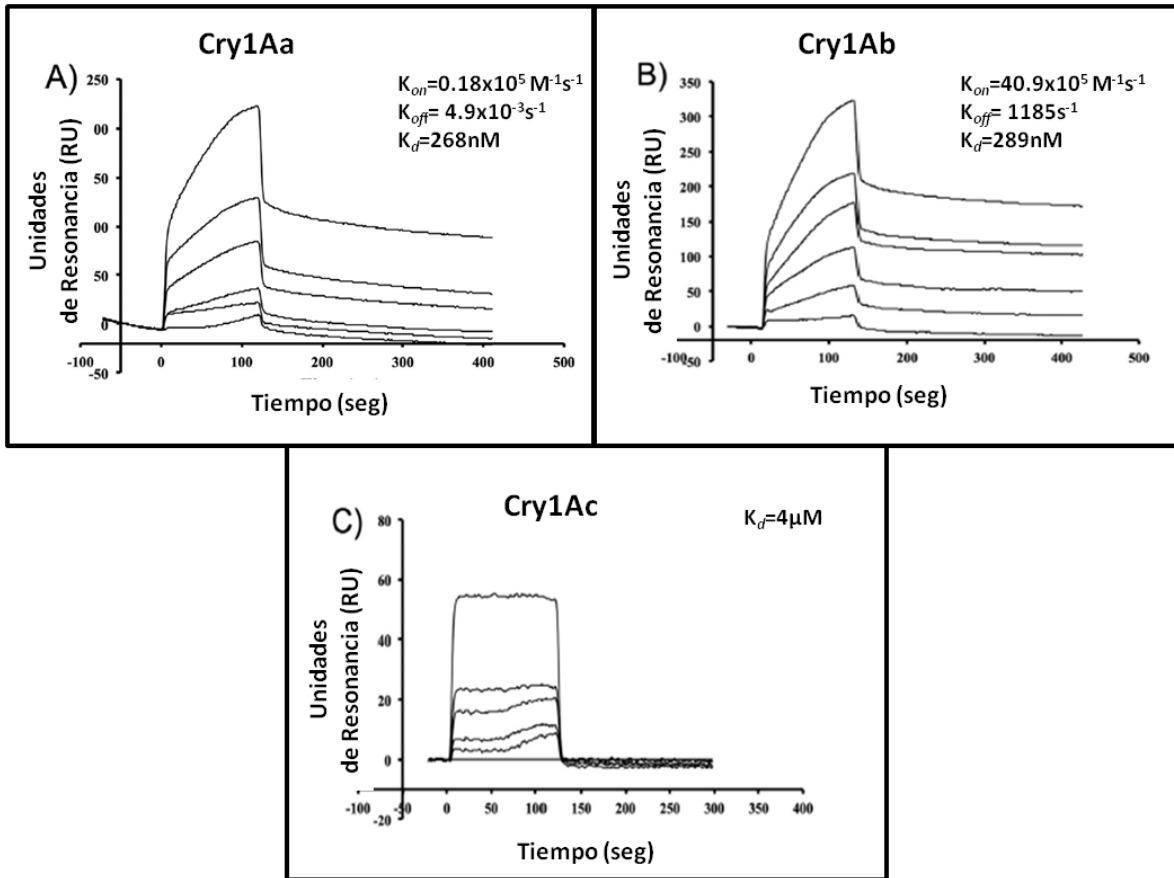


Figura No.11 Análisis de SPR de la unión de Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac a la fosfatasa alcalina inmovilizada.

Silenciamiento de APN1 y ALP en larvas de *M. sexta*: alimentación con RNAdc

En nuestro organismo modelo, *M. sexta*, existen reportadas 4 isoformas de aminopeptidasa N. Este proyecto se enfocó sólo en la isoforma 1 (No. de acceso AF123313.1) de esta proteína porque es la que se ha reportado que une a las toxinas Cry1A. Para realizar el silenciamiento específico de la APN1 mediante RNAdc se requirió una secuencia específica de este gene, para lo cual se realizó un alineamiento de las secuencias nucleotídicas de las cuatro isoformas de aminopeptidasa N presentes en *M. sexta*.

El alineamiento reveló que la isoforma 1 comparte una identidad con la APN2 del 50%, con la APN3 del 48%, y con la isoforma 4 del 53%. En cuanto a los alineamientos realizados

con las secuencias aminoacídicas, los resultados revelaron que esta isoforma comparte una identidad con la isoforma APN2 del 32%, mientras que con APN3 y APN4, del 36% y 42%, respectivamente. Con base en los datos obtenidos del alineamiento de las secuencias nucleotídicas, se eligieron tres regiones donde hubiera la menor identidad (10%) entre las cuatro isoformas. La localización de las tres regiones de APN1 elegidas para silenciar fueron: una región que comprende del nucleótido 22 al 385 (363pb), la segunda región que va del nucleótido 1433 al 1741 (308bp) y una tercera que abarca del nucleótido 2417 al 2710 (293bp). Estas regiones se localizaron en sitios no conservados entre las secuencias de aminoácidos de estas cuatro isoformas (Figura No. 12a).

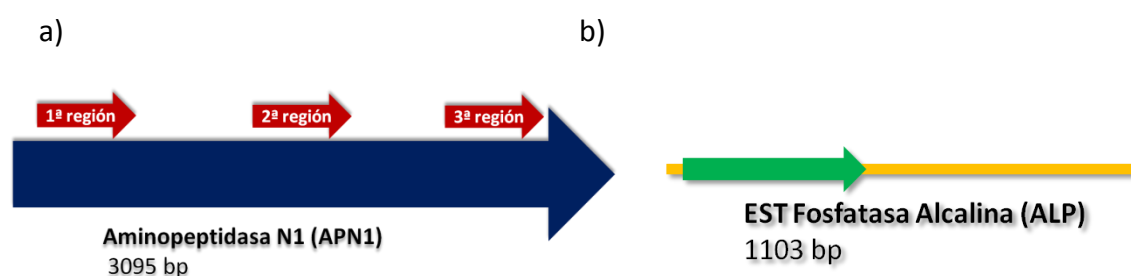


Figura No. 12 Representación esquemática de la localización de las regiones seleccionadas para silenciar APN1 y ALP.

Para la fosfatasa alcalina, su función como receptor de las toxinas Cry1A se ha descrito recientemente, sin embargo, Pauchet *et al.*, (2010) obtuvo una biblioteca de ESTs, en la que se pudo identificar una secuencia que corresponde con fosfatasa alcalina. Con base en esta secuencia, se diseñaron *primers* para amplificar un fragmento de aproximadamente 450 bp (Figura No. 12b).

Las regiones seleccionadas de aminopeptidasa N1 y fosfatasa alcalina fueron clonadas individualmente en el vector pLitmus 28i. El sitio múltiple de clonación de este vector está flanqueado por dos secuencias del promotor de la T7 RNA polimerasa, los cuales son requeridos en la síntesis del RNA de doble cadena, para llevar a cabo el silenciamiento post transcripcional de APN1 y ALP.

En ensayos preliminares de silenciamiento de APN1 se observó que la región 2, que comprende del nucleótido 1433 al 1741, tenía un porcentaje del 80 al 90% de individuos silenciados. Este porcentaje de silenciamiento fue menor con las otras dos regiones, por lo cual se eligió la región 2 para silenciar. Los resultados obtenidos mediante PCR cuantitativo en tiempo real mostraron que los transcritos de ALP y APN1 fueron reducidos 80 y 84% respectivamente (Figura 13a y 13b), mientras que en los ensayos de *Western*

blot indicaron que hay una disminución de la expresión de estas proteínas (Figura 13a y 13b).

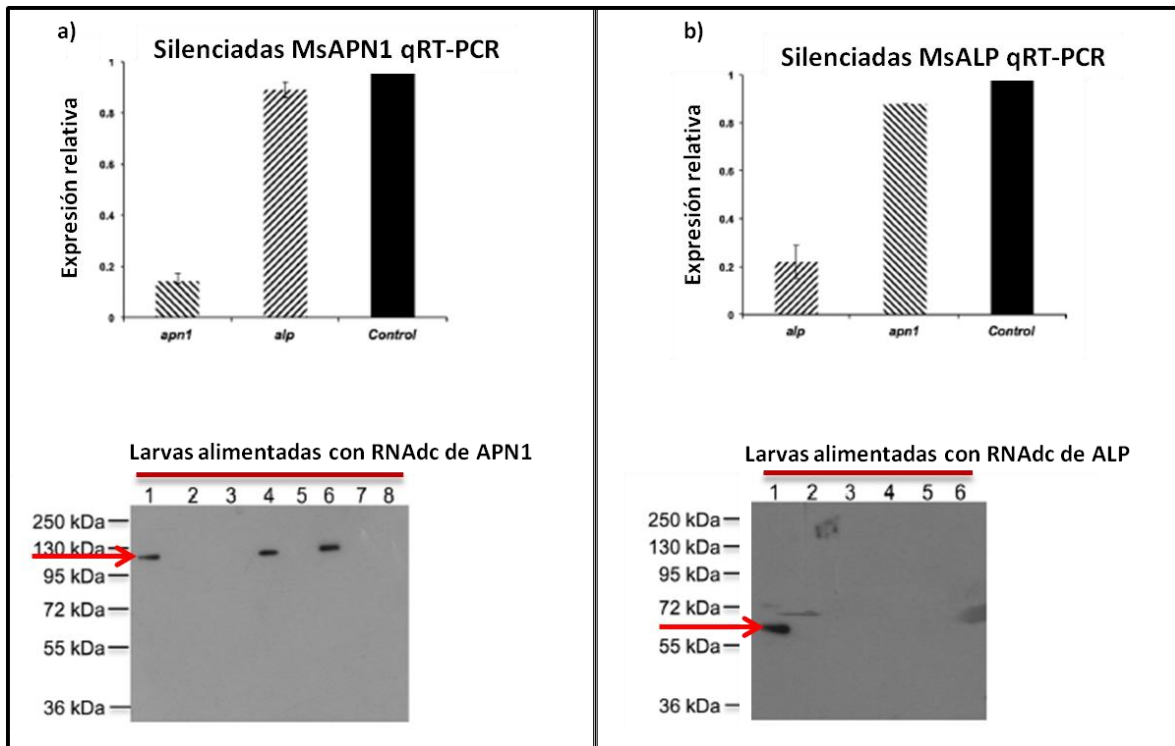


Figura No.13 Expresión relativa del transcrito y de la proteína de los receptores anclados por GPI. a) Expresión relativa del transcrito de ALP y la expresión de la proteína detectada en *Western blot*. b) Expresión relativa del transcrito de APN1 y la expresión de la proteína detectada en *Western blot*. El carril 1 de a) y b) corresponde al control alimentado con agua, mientras que los carriles 2 al 8 y el 2 al 6 muestran a larvas alimentadas con RNAdc de APN1 y ALP, respectivamente. Cada carril muestra el análisis de una larva alimentada con RNAdc.

La especificidad del efecto de RNA de doble cadena de APN1 y ALP en las larvas de *M. sexta* se corroboró mediante PCR cuantitativo en tiempo real. Los resultados indicaron que la expresión del transcrito de APN1 o ALP en el tratamiento de alimentación con RNAdc de ALP o APN1, respectivamente, se encontraban sin afectar, lo que indica que estos RNAs interferentes son específicos para estas proteínas (Figura No. 13).

Posteriormente, dada la existencia de otras isoformas de Aminopeptidasa N en *M. sexta* con un alto porcentaje de identidad entre ellas, fue necesario observar si el efecto de que el RNAdc diseñado era específico para la Aminopeptidasa N1 y no afectaba la expresión del transcrito de las otras tres isoformas. Para llevar a cabo este objetivo, se realizaron ensayos de PCR en las larvas alimentadas con RNAdc de APN1, en los cuales se pudo

observar que en la larva silenciada de APN1 (larva 2), la expresión de los transcritos de APN2, APN3 y APN4 no se afecta (Figura No. 14), esto permitió analizar sólo el efecto de la ausencia de esta isoforma en el mecanismo de toxicidad.

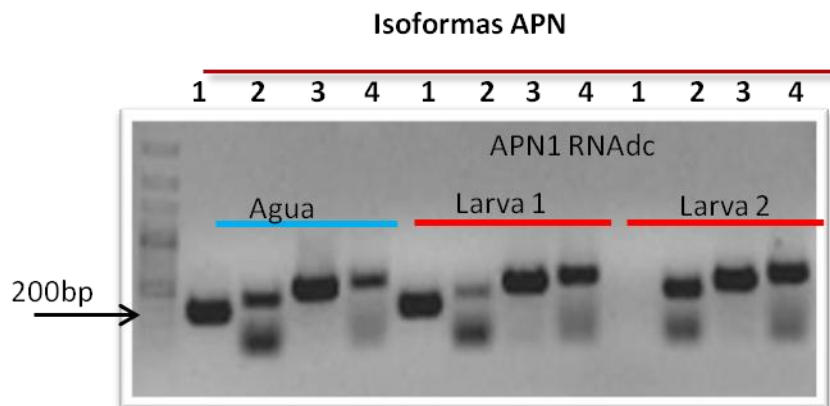


Figura No. 14 Análisis de especificidad del silenciamiento de APN1. La expresión de los transcritos de APN2, APN3 y APN4, después de alimentar con RNAdc de APN1, fue monitoreada por PCR.

Participación de la Aminopeptidasa N1 y Fosfatasa Alcalina de *M. sexta*, en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1As

Para determinar cómo participan los receptores aminopeptidasa y fosfatasa alcalina en la actividad tóxica de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac se realizaron bioensayos con larvas silenciadas de estos receptores.

Los resultados obtenidos indicaron que ambas proteínas, ALP (barra con líneas diagonales) y APN1 (barra con líneas horizontales), participan en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1As pero cada una con un efecto particular en la disminución de la susceptibilidad a estas toxinas, lo que nos permite inferir sobre su participación en el mecanismo de acción de estas toxinas (Figura No. 15). Los controles empleados en este ensayo fueron 3: el primer control son larvas alimentadas con agua (barra gris), donde se registró 100% de mortalidad, ya que se empleó una dosis letal que supera de 10 a 20 veces la dosis letal media de las toxinas Cry1As y se contaba con la presencia de ambos receptores anclados por GPI; el segundo y tercer control en este experimento consistieron en RNAdc no específicos, β – galactosidasa (LacZ) y la proteína de unión a maltosa (MalE), donde se esperaba un efecto similar al tratamiento con agua (Figura No. 15d).

En el caso de la toxina Cry1Aa (Figura No. 15a), las larvas alimentadas con RNAdc de ALP y de APN1 mostraron un porcentaje de mortalidad similar cuando son retadas con esta toxina, del 41% y 59%, respectivamente, lo que indica que la toxina Cry1Aa depende de las

dos proteínas para ejercer su efecto tóxico. Este mismo efecto fue observado en los resultados obtenidos con las larvas alimentadas con RNAdc, y retadas con la toxina Cry1Ab, donde se observa que las larvas alimentadas con el tratamiento de ALP fueron menos susceptibles a la toxina Cry1Ab, con una mortalidad del 23%, en comparación de las alimentadas con RNAdc de APN1, cuya mortalidad registrada es del 61% (Figura No. 15b). Estos resultados sugieren que al igual que la toxina Cry1Aa, la toxina Cry1Ab requiere de la participación de ambos receptores en su mecanismo de acción, pero la fosfatasa alcalina tiene un rol predominante. Este resultado correlaciona con lo encontrado por Arenas *et al.*, 2010, donde se involucra a la fosfatasa alcalina en el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ab, si bien este resultado también involucra a APN1 como participante *in vivo* en su mecanismo de acción.

En el caso de la toxina Cry1Ac, las larvas alimentadas con RNAdc de APN1 tuvieron una mortalidad del 35%, mientras que las larvas alimentadas con el RNAdc de ALP del 76% (Figura No. 15c). En este caso, el resultado indica que Cry1Ac depende en mayor medida de la participación de APN1 en su mecanismo de acción. Este resultado confirma la participación *in vivo* de APN1 en el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ac, y establece que esta toxina depende en mayor medida en esta molécula para ejercer su efecto tóxico.

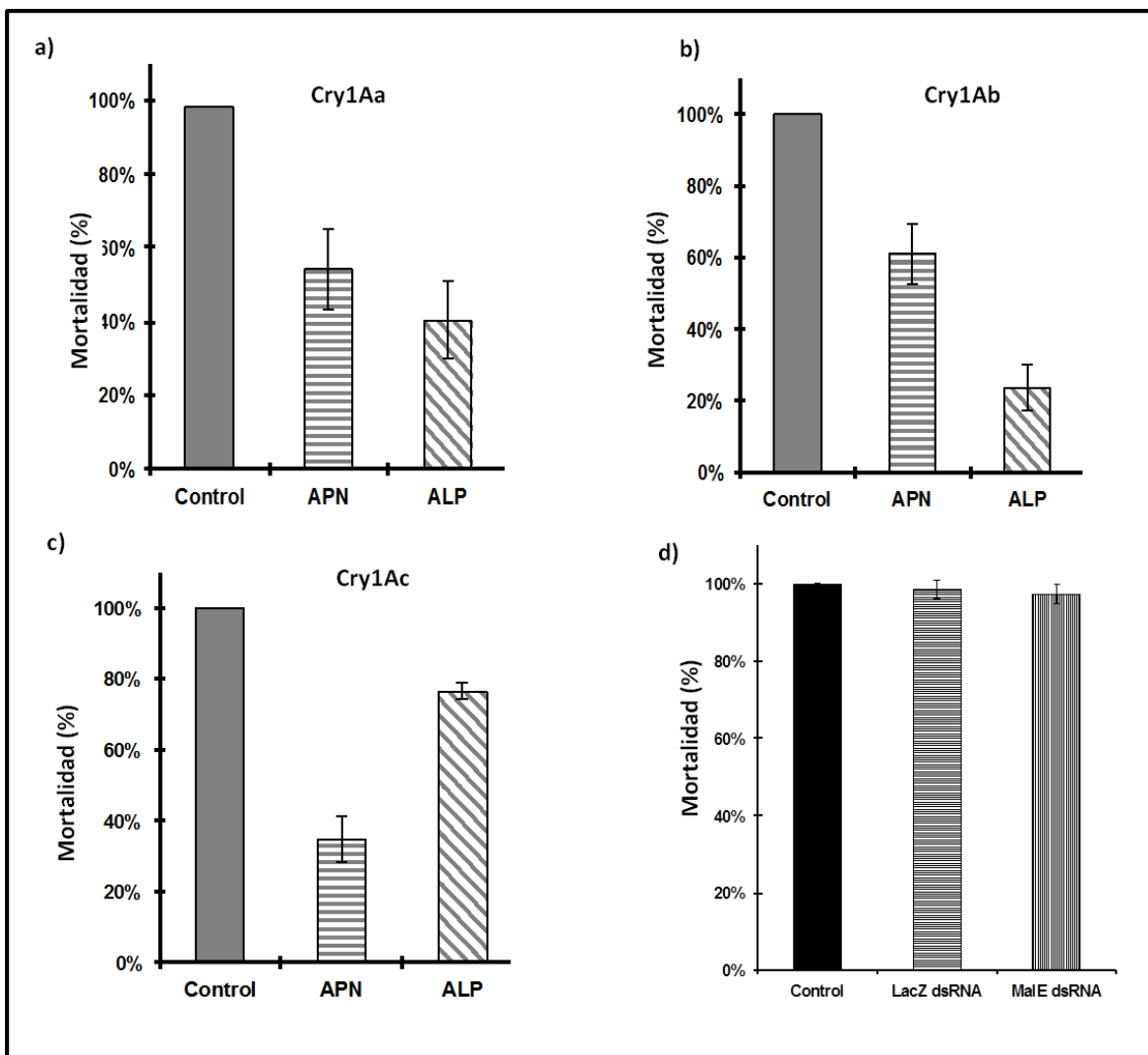


Figura No 15 Efecto diferencial del RNA de doble cadena en larvas, de *M. sexta*, retadas con las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac (25ng/cm²). Este experimento fue realizado por triplicado en tres repeticiones independientes. Las barras de error denotan la desviación estándar.

La correlación entre la disminución de susceptibilidad a las toxinas Cry1As y la disminución de la expresión de ALP y APN1 fue analizada mediante RT-PCR y *Western blot*. Este análisis se realizó individualmente con las larvas supervivientes al bioensayo.

La expresión del transcrito de ALP y APN1 se analizó mediante RT-PCR y se observó una disminución de la expresión de los transcritos de ALP o APN1 en las larvas que sobrevivieron al reto de las toxinas Cry1As (Figura No. 16a). En el caso de la expresión de las proteínas, también se observó el mismo efecto de disminución individual de la expresión de ALP (65kDa) o APN1 (120kDa) (Figura No. 16b). Esto permite concluir que

ambos receptores están participando *in vivo* en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1As.

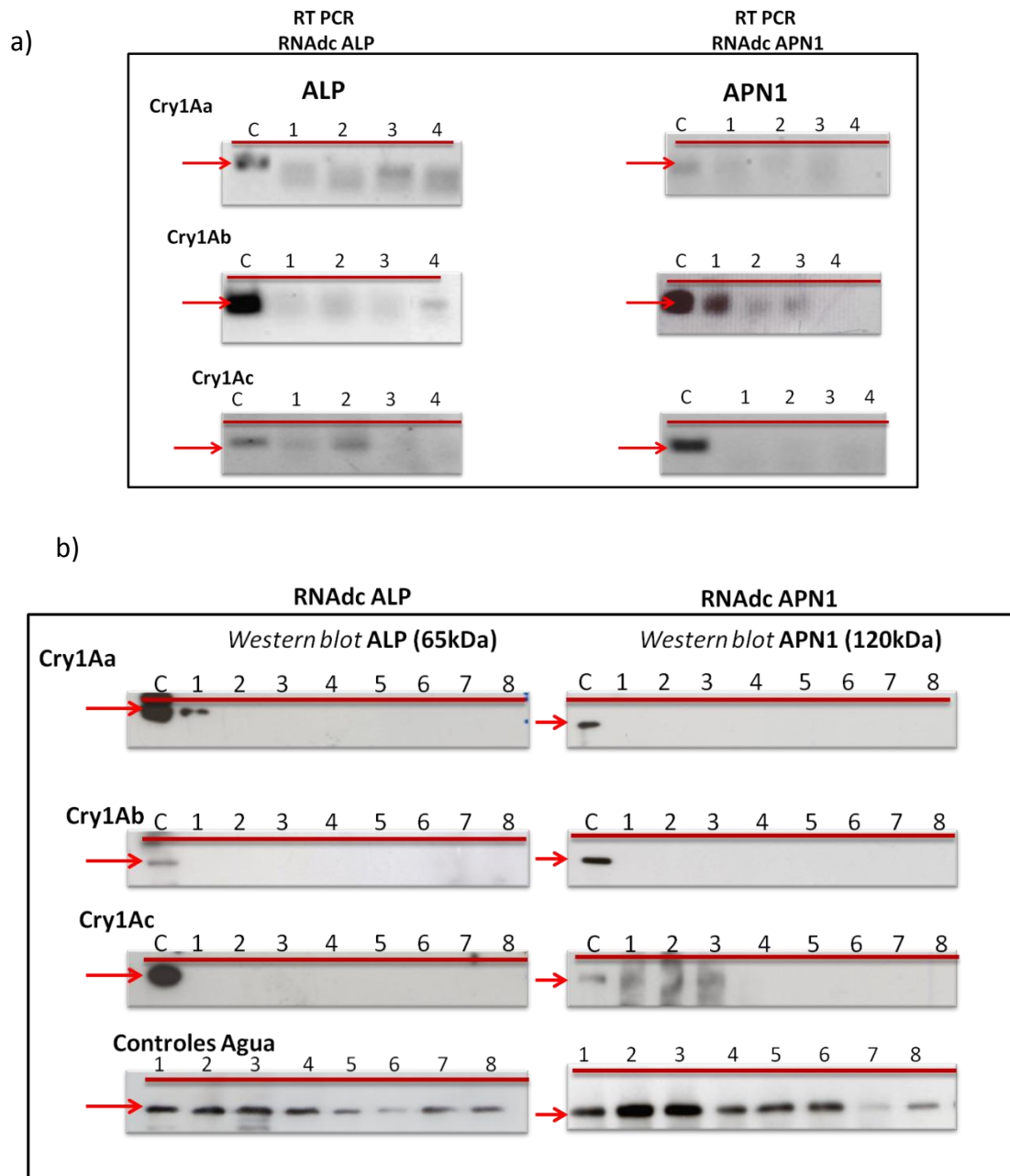


Figura No. 16 Disminución de la expresión de los transcritos y las proteínas de ALP y APN1 en larvas tratadas con RNA de doble cadena que sobrevivieron al reto con las toxinas Cry1As. a) Verificación por RT-PCR de la expresión del transcrito en las larvas tratadas con RNAdc de ALP o APN1 y retadas con cada una de las toxinas Cry1As. b) Verificación por *Western blot* de la expresión de las proteínas, en las larvas tratadas con RNAdc de ALP (65kDa) o APN1 (120 kDa) y retadas con cada una de las toxinas Cry1As. El carril C corresponde al control alimentado con agua, los carriles restantes representan una muestra de intestino de larva sobreviviente.

La aminopeptidasa N1 y la fosfatasa alcalina también participan en el mecanismo de acción de la toxina Cry1AbMod y Cry1AcMod

Algunos mecanismos de resistencia a las toxinas Cry en insectos lepidópteros han sido asociados a la alteración en la interacción toxina-receptor. La resistencia de algunos lepidópteros a las toxinas Cry ha sido ligada a mutaciones con el gene de caderina. Una estrategia efectiva para combatir la resistencia a las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac fue la producción de toxinas modificadas (Cry1AbMod y Cry1Ac Mod) que carecen de la hélice $\alpha 1$. Estas toxinas modificadas tienen la capacidad de oligomerizar sin interactuar con el receptor tipo caderina, BtR1. La toxina Cry1AbMod fue tóxica para larvas de *M. sexta* silenciadas en el receptor tipo caderina y tanto Cry1Ab y Cry1AcMod fueron activas para una cepa de *Pectinophora gossypiella*, cuyo mecanismo de resistencia está asociado a mutaciones en un gene de caderina (Soberón *et al.*, 2007).

El bioensayo realizado con las toxinas Cry1AbMod y Cry1AcMod tuvo como objetivo validar la participación de APN1 y ALP en el mecanismo de acción de estas toxinas. ¿Estos son necesarios para la toxicidad de las Cry1AsMod? En este ensayo, las larvas de *M. sexta* se alimentaron con RNAdc de ALP (barra gris claro), APN (barra negra) y el receptor tipo caderina BtR1 (barra con líneas horizontales) y se retaron con una sola dosis de toxina Cry1AbMod (25 ng/cm²) (Figura No. 17a) y Cry1AcMod (50 ng/cm²) (Figura No. 17b). Los resultados obtenidos indican que hay una interacción diferencial de los receptores APN1 y ALP con las toxinas Cry1AbMod y Cry1AcMod, similar a las toxinas sin modificar.

La fosfatasa alcalina tiene una mayor participación en la disminución de susceptibilidad a la toxina Cry1AbMod, similar a la observada a la toxina sin modificar (Figura No. 17a). En cuanto a lo obtenido con las larvas alimentadas con RNAdc de BtR1, fueron susceptibles a la toxina Cry1AbMod, lo que corresponde a lo reportado por Soberón *et al.*, 2007, ya que estas toxinas “saltan” la interacción con este receptor y oligomerizan para interactuar con los receptores anclados por GPI, por lo que siguen siendo tóxicas para estas larvas silenciadas en BtR1. Con respecto a los resultados obtenidos con la toxina Cry1AcMod, se observó el mismo efecto que en la toxina silvestre: la aminopeptidasa N1 tiene un papel predominante en el mecanismo de acción en esta toxina y el efecto de la toxina Cry1AcMod en las larvas alimentadas con RNAdc de BtR1 fue de susceptibilidad a esta toxina (Figura No. 17b). Estos resultados indican que el mecanismo de acción está conservado en ambas versiones de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac, tanto silvestres como modificadas en cuanto al requerimiento de los receptores APN1 y ALP. La función de estos receptores con las toxinas Cry1AbMod y Cry1AcMod, permite inferir que tanto la fosfatasa alcalina como la aminopeptidasa N1 tienen un papel importante durante la interacción con la estructura oligomérica de las toxinas Cry1As, esto es en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1As, ya que las toxinas modificadas tienen la capacidad de oligomerizar sin

interactuar con el receptor tipo caderina, y tienen un comportamiento similar al observado con las toxinas silvestres.

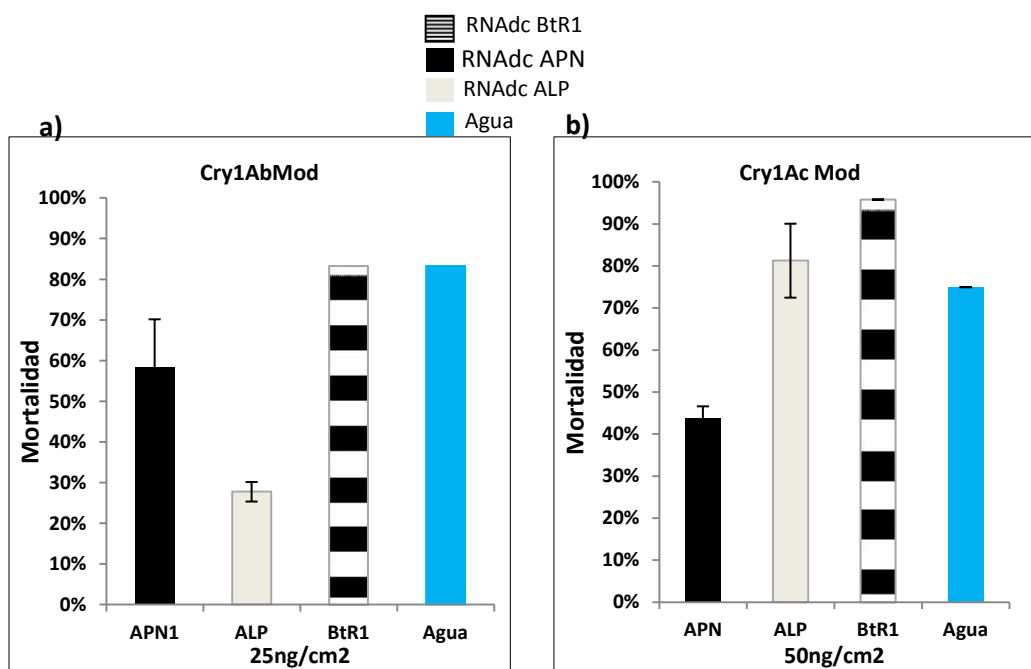


Figura No. 17 Efecto del RNAdc en larvas de *M. sexta* expuestas con la toxina Cry1AbMod (a) y Cry1AcMod (b).

El receptor tipo caderina tiene una participación diferencial en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1As

La participación del receptor BtR1 en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1A ha sido estudiada extensivamente en diversos insectos plaga. Sin embargo, actualmente no existe un estudio en *M. sexta* donde se valide la participación *in vivo* de esta molécula en el mecanismo de acción de las tres toxinas Cry1A; por este motivo se analizó, mediante RNA de interferencia, la participación de BtR1 en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1A en *M. sexta*.

Primero, se alimentaron larvas de *M. sexta* con RNAdc del receptor BtR1 y posteriormente se retaron con una dosis (25 ng/cm²) de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac (Figura No. 18). Los resultados obtenidos indican que hay una dependencia diferencial con las toxinas Cry1As.

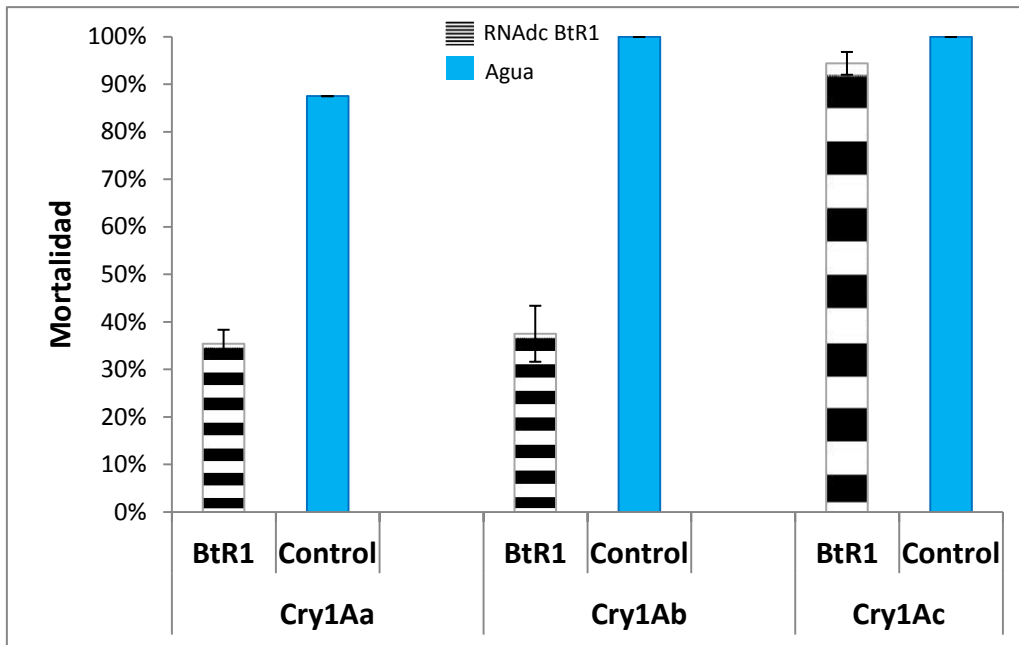


Figura No 18 Efecto diferencial del RNA de doble cadena de BtR1 en larvas, de *M. sexta*, retadas con 25 ng/cm² de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac.

En este experimento se observó que BtR1 participa en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab, ya que se observa una disminución en la mortalidad de este tratamiento con RNAi del 65% y 62%, respectivamente. Mientras que en el caso de la toxina Cry1Ac, la mortalidad es similar al control (alimentado con agua y retado con toxina), lo que indica BtR1 no está participando en el mecanismo de acción de esta toxina y sugiere la existencia de otro receptor que esté llevando a cabo las funciones del receptor tipo caderina.

Expresión de los receptores de las toxinas Cry1As, en *M. sexta*, en la línea celular de *Spodoptera frugiperda* Sf21

El objetivo de este apartado en el proyecto fue demostrar la participación de los receptores de las toxinas Cry1As en sus mecanismos de acción, mediante un sistema *in vitro* que permita explorar posteriormente, mutaciones de los receptores y toxinas que pueden afectar la interacción *in vivo* de estas moléculas, para así comprender los mecanismos de acción de estas toxinas.

En reportes previos se ha demostrado que es posible expresar los receptores de las toxinas Cry1As de *M. sexta*: la aminopeptidasa N1 se expresó en células Sf21, las cuales provienen del ovario del lepidóptero *Spodoptera frugiperda*, y no son susceptibles a las toxinas Cry1A (Luo *et al.*, 1999); el receptor tipo caderina se ha expresado tanto en células

del lepidóptero *T. ni* (*High five*) como en células *Sf21* (Zhang *et al.*, 2006; Jurat-Fuentes y Adang, 2006). La fosfatasa alcalina de *M. sexta* no ha sido expresada en líneas celulares, pero se ha reportado que la fosfatasa alcalina del díptero *A. aegypti* ha sido expresada con éxito en células *Sf9* (Dechklar *et al.*, 2011), las cuales son derivadas de las células *Sf21*.

Los receptores Bt-R1, APN1 y ALP de *M. sexta* fueron clonados en dos vectores de expresión: pIZT/V5His (Invitrogen), en el cual se ha expresado exitosamente al receptor tipo caderina (Zhang *et al.*, 2006; Jurat-Fuentes y Adang, 2006) y el vector pHSP70 (Huyhn y Zieler, 1999) (Figura No. 19), el cual tiene características similares al vector utilizado por Luo *et al.*, 1999 para expresar a la aminopeptidasa N1 de *M. sexta*.

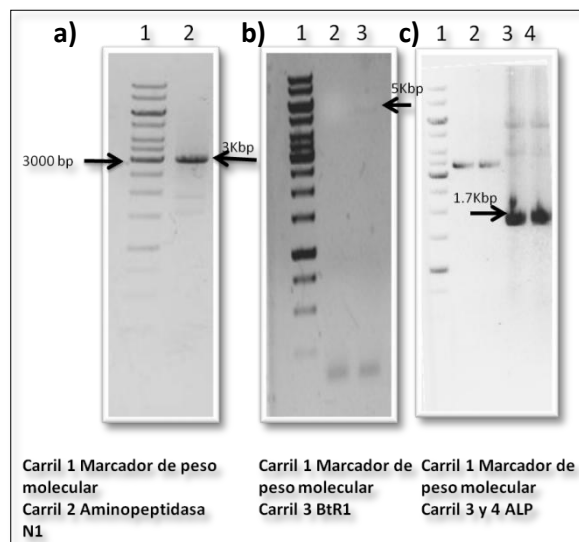


Figura No. 19 Clonación de las tres moléculas descritas como receptores de las toxinas Cry1As.

La expresión heteróloga independiente de estas tres proteínas, clonadas tanto en el vector inducible pHsp70, como en el vector con la fusión GFP, pIZT (Invitrogen), fue realizada en la línea celular Sf21. La expresión de estas proteínas en esta línea celular no se pudo lograr, ya que los productos detectados por *Western blots*, que se realizaron para verificar su expresión en la línea celular, eran truncos.

La búsqueda de otra línea celular en la que se pueda expresar correctamente a ALP, APN1 y al receptor tipo caderina, es una alternativa que permitiría establecer un sistema que ayude a estudiar y explorar la participación e importancia de los sitios de interacción de los receptores con las toxinas Cry1As, así como también explorar más regiones de las toxinas involucradas en la interacción con estos receptores.

Discusión

Las estrategias que emplean las toxinas formadoras de poro (PFT) para ejercer toxicidad en sus organismos blanco, requieren de interacciones complejas con una o varias moléculas localizadas en la superficie de la membrana celular. Estas interacciones se caracterizan por ser altamente especializadas y selectivas. Al igual que otras PFTs, las toxinas Cry requieren de la participación de varias proteínas, localizadas en las microvellosidades intestinales, para ejercer su efecto tóxico en los organismos susceptibles.

La identificación de posibles receptores de las toxinas Cry ha sido una tarea realizada básicamente mediante ensayos de unión *in vitro*, que no necesariamente correlacionan con la función de estas moléculas como receptores *in vivo*. Con la información obtenida en diversos trabajos realizados *in vitro*, nuestro grupo de investigación ha propuesto un mecanismo molecular donde la toxina Cry1Ab interactúa secuencialmente con al menos tres moléculas en el lepidóptero *M. sexta* (Francis y Bulla, 1997; Pacheco *et al.*, 2009; Arenas *et al.*, 2010). Entre las moléculas descritas *in vitro* con las que esta toxina interactúa se encuentran dos proteínas ancladas por GPI, la Aminopeptidasa N1 y Fosfatasa Alcalina.

Entre las diferentes estrategias *in vitro* que se han utilizado para la identificación y descripción del mecanismo de acción de las toxinas Cry se encuentran tanto el reconocimiento de moléculas de unión mediante ensayos unión de ligando, como la estimación de la unión *in vitro*. La unión *in vitro* tanto de la Aminopeptidasa N1 (Masson *et al.*, 1995), así como la del receptor tipo caderina (Francis y Bulla, 1997) con las tres toxinas Cry1As, Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac ha sido caracterizada. En contraparte, la información de la fosfatasa alcalina de *M. sexta* como proteína de unión de las toxinas Cry1A es escasa, a pesar de que ésta fue descrita como proteína que facilitaba la formación del poro por Sangadala *et al.*, en 1994 y unía a la toxina Cry1Ac (McNall y Adang, 2003), si bien no se contaba con la información necesaria para involucrar a esta molécula en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1A en *M. sexta*; fue hasta el trabajo Arenas *et al.*, 2010 donde se caracterizó la unión *in vitro* de ALP sólo con la toxina Cry1Ab. En este estudio, en ensayos de unión de ligando, se demostró que las toxinas Cry1A se unen de forma diferencial a los receptores anclados por GPI localizados en el tejido intestinal de *M. sexta*. Las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab se unen a la fosfatasa alcalina en el primer y tercer estadio de desarrollo larvario, pero la toxina Cry1Ac se une solamente a la APN1 a lo largo de todo su desarrollo larvario (Figura No. 7). Estos resultados sugieren la importancia de cada una de estas moléculas en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1A. Esta observación es importante porque se ha propuesto que existe un aumento entre la unión de las toxinas Cry con sus posibles receptores a lo largo del desarrollo y la disminución de la actividad biológica de estas toxinas en relación con el crecimiento de los

insectos susceptibles. Rodríguez – Chamorro (2013) observó que la susceptibilidad de *M. sexta* a la toxina Cry1Ca disminuye hasta siete veces cuando son retadas en el tercer estadio de desarrollo con respecto a la actividad de esta toxina en el primer estadio de desarrollo: simultáneamente registró cambios en la unión de esta toxina con una isoforma de ALP, que sólo fue posible de observar en los primeros estadios de desarrollo larvario. Esta observación es importante ya que en el laboratorio, la actividad biológica de las toxinas Cry1 se registra regularmente en el primer estadio de desarrollo larvario, donde la actividad de estas toxinas Cry es más alta. En este estudio se propone, al igual que Gilliland *et al.*, 2002; Arenas *et al.*, 2010 y Rodríguez – Chamorro, 2013, que el análisis y la búsqueda de los receptores de las toxinas Cry1 son recomendables durante los primeros estadios larvarios, donde la actividad de las toxinas Cry es mayor, lo que puede facilitar la identificación de los posibles receptores de estas toxinas.

La caracterización de la interacción de la ALP de *M. sexta* con las toxinas Cry1A reveló que estas tres toxinas pueden unirse a ALP: Cry1Aa y Cry1Ab tienen una afinidad similar por este receptor, de 289 y 268 nM, respectivamente, mientras que la toxina Cry1Ac tiene una afinidad 16 veces menor por esta proteína (4 μ M) (Figura No. 11). Esta unión disminuida puede ser debida a que la proteína recombinante no está glicosilada. El hecho de que las tres toxinas se unan a ALP no es sorprendente, Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac han mostrado unir a APN1 en el trabajo de Masson *et al.*, 1995 y al receptor tipo caderina como lo indican Francis y Bulla *et al.*, 1997. Además hay que recordar que estas tres toxinas son estructuralmente similares, por lo que tal vez estén compartiendo sitios de unión por este receptor (ver más adelante), pero también es importante mencionar nuevamente que los dominios II y III de estas tres toxinas son las regiones más variables entre ellas, éstas contienen los sitios de interacción con los receptores y pueden ser las regiones que estén determinando la disminución de la unión de la toxina Cry1Ac con la fosfatasa alcalina. La unión *in vitro* de la fosfatasa alcalina con las toxinas Cry1As es un punto de referencia importante para este estudio; sin embargo, uno de los objetivos de este proyecto también fue demostrar la participación *in vivo* de ALP y APN1 en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1As.

Algunos trabajos han demostrado la funcionalidad *in vivo* de los receptores de las toxinas Cry1A. La expresión en líneas celulares del receptor tipo caderina resulta en susceptibilidad a las toxinas Cry1A (Meng *et al.*, 2001; Dorsch *et al.*, 2002; Hua *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006). En el caso de APN1, la tarea no ha sido fácil de interpretar, ya que hay dos casos que contradicen su participación. En el estudio realizado por Luo *et al.*, 1999, con la APN1 expresada en la línea celular SF21 de *M. sexta*, se observó la falta de susceptibilidad a la toxina Cry1Ac, por lo que no fue posible concluir sobre su participación en el mecanismo de acción *in vivo* de esta toxina. En cambio, en el trabajo de Gill y Ellar

(2002), se observó que la expresión heteróloga de APN1 en *Drosophila melanogaster*, una especie naturalmente no susceptible, otorga sensibilidad a la toxina Cry1Ac.

En este estudio mediante el uso de la técnica de RNA de interferencia analizamos *in vivo* el papel de la APN1 y la ALP en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1As. Una característica importante de esta herramienta es el efecto específico sobre las proteínas blanco, de manera que el silenciamiento específico de ALP y APN1 permitió estudiar como estas proteínas están participando *in vivo* en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1A.

En primera instancia, se confirmó si el silenciamiento de ALP y APN1, mediado por alimentación con RNAdc en *M. sexta* es posible, previo a emplear esta herramienta se verificó la disminución de la expresión tanto del transcrito como de la proteína de estos receptores anclados por GPI, demostrando que el método es funcional en nuestro modelo de estudio. Las larvas de *M. sexta* tratadas con RNA de interferencia mostraron una disminución en la expresión en el transcrito y la proteína de nuestros blancos (Figura No. 12), así como también estos RNAs interferentes mostraron ser específicos para las proteínas de estudio (Figuras No. 12 y No. 13). Estos resultados permitieron explorar la función *in vivo* de ALP y APN1 como proteínas de unión de las toxinas Cry1A y discernir sobre su participación *in vivo* en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1A en *M. sexta*.

Para entender como estas proteínas participan en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1As, después disminuir la expresión de ALP y APN1, las larvas silenciadas fueron retadas con una dosis de 25 ng/cm² (10 a 20 veces la dosis letal media de las toxinas Cry1As) (Figura No. 14), observándose que tanto ALP como APN1 están participando *in vivo* en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1A, ya que su silenciamiento resultó en la disminución en la susceptibilidad de *M. sexta* a estas toxinas. El tratamiento con RNA de interferencia fue el responsable de conferir esta disminución, ya que la mortalidad de los controles tratados con agua retados con las tres toxinas Cry1As fue del 100%, al igual que la de las tratadas con RNAdc inespecíficos, como el de LacZ y MalE. La toxina Cry1Aa depende de ambos receptores para ejercer su efecto tóxico, ya que ambos tratamientos de RNAdc de ALP y APN1, mostraron una mortalidad similar (41% y 59%, respectivamente) cuando son retadas con esta toxina. En cuanto a los resultados correspondientes a la toxina Cry1Ab, las larvas alimentadas con RNAdc de ALP y retadas con esta toxina, fueron menos, en comparación de las alimentadas con RNAdc de APN1. En el caso particular de la toxina Cry1Ac, ésta depende en mayor medida de la participación de APN1 en su mecanismo de acción, en los organismos tratados con RNAdc de APN1 y retados con Cry1Ac se registró una mortalidad de aproximadamente del 30%, en comparación del 76% en el caso del tratamiento de ALP. Estas observaciones aportan información importante para el conocimiento del mecanismo de acción de las toxinas Cry1As en el lepidóptero *M.*

sexta: ALP y APN1 están actuando de forma diferencial, y ambas están participando en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab, mientras que para el mecanismo de acción de Cry1Ac, APN1 desempeña un papel predominante. La participación *in vivo* de fosfatasa de alcalina de *M. sexta* en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1As constituye otra aportación relevante de este proyecto. Esta molécula ya había sido propuesta como un posible receptor de las toxinas Cry1As, sin embargo, no se había concretado la evidencia que la involucrara directamente en su mecanismo de acción.

La participación diferencial de APN1 y ALP con las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac, es similar a la observada con las toxinas Cry1AbMod y Cry1AcMod y correlacionó con la unión diferencial *in vitro* de APN1 y ALP con las toxinas Cry1As. Las toxinas modificadas fueron diseñadas para contender con la resistencia a la toxina Cry1Ac asociada al receptor tipo caderina ya que poseen la capacidad de oligomerizar sin interactuar con este receptor. Esta característica permite inferir cual puede ser el papel de ambos receptores en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1As, estos resultados indican que ALP y APN1 están participando durante la interacción con el oligómero de la toxina, previo a su inserción en la membrana, dado que estas mutantes forman el oligómero y recurren a los receptores anclados por GPI para ejercer su efecto tóxico. La aparición de resistencia a las toxinas Cry1 en otros organismos lepidópteros ha sido asociada con la disminución de estos dos receptores anclados por GPI, correlacionando en cierta medida con la disminución de susceptibilidad a las toxinas Cry1As silvestres y Cry1AMod, en los tratamientos de RNAdc de APN1 y ALP en *M. sexta*. Este fenómeno de resistencia ha sido encontrado en cepas resistentes a la toxina Cry1Ac de los lepidópteros *H. virescens* y *H. armigera*, y en cepas resistentes a la toxina Cry1Fa de *S. frugiperda*, donde la expresión del RNA mensajero, de la proteína y la actividad enzimática de ALP se encuentra disminuida (Jurat-Fuentes *et al.*, 2011). En el caso de APN1, la resistencia a la toxina Cry1Ac de *T. ni*, se asoció con una reducción en la expresión del RNA mensajero de esta isoforma de aminopeptidasa N, y también se observó que había una disminución de la expresión de esta proteína (Tiewsi y Wang, 2010). La aparición de estos mecanismos de resistencia tiene un gran impacto en el manejo de las plagas en cultivos *Bt*, ya que se habían descrito previamente eran asociados al receptor tipo caderina, así mismo, plantea la búsqueda de nuevas alternativas para manejar las poblaciones de insectos plagas resistentes a las toxinas Cry1.

La unión diferencial de los receptores anclados por GPI con las toxinas Cry1A, también se observó en el trabajo de inmunolocalización *in vitro* de estas toxinas, en el intestino de *M. sexta*, realizado por Chen *et al.*, 2005. En este trabajo se observó que había una inmunolocalización diferencial de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac a lo largo del intestino medio de *M. sexta*. Éstas se localizaban en las regiones del intestino medio

donde se encontraban inmunoteñidos los receptores descritos para estas toxinas, el receptor tipo caderina, ALP y APN1. La toxina Cry1Ac se localizó en la misma área donde se inmunolocalizó APN1, pero no donde inmunolocaliza BtR1; mientras que Cry1Ab y Cry1Aa se unieron a la misma área donde se localizó ALP y BtR1. Esta localización diferencial de las toxinas y de los receptores en el intestino de *M. sexta* nos indican la existencia de diferencias en las uniones *in vitro* entre estas moléculas. Estas observaciones soportan la interacción diferencial *in vivo* que se observó en este proyecto.

El efecto de ambas proteínas ancladas por GPI con las toxinas Cry1A es interesante, ya que se ha observado que las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac tienen un efecto similar en la mortalidad en *M. sexta* (ver Figura No. 6b), a pesar de las diferencias que se han observado en las estructuras involucradas en la interacción con los receptores: los dominios II y III. Los dominios II y III de las toxinas Cry1As son las más variables entre ellas. Las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac comparten un 99% de identidad en el dominio II, mientras ambas comparten una identidad de 69% con la toxina Cry1Aa. En contraste, la toxina Cry1Aa y Cry1Ab comparten un dominio III muy similar con 98% de identidad, mientras que el dominio III de la toxina Cry1Ac comparte sólo el 38% de identidad con estas toxinas (Figura 6a). Es posible que además de las diferencias en los dominios II y III, existan otros factores que están determinando las diferencias en las interacciones de las toxinas Cry1As, como la estructura de los sitios de unión de los receptores.

El estudio de las interacciones *in vitro* ha permitido conocer la localización de las regiones de interacción de los dominios II y III de las toxinas Cry1As con los receptores descritos de estas toxinas en *M. sexta*. Las estructuras más variables dentro del dominio II de las toxinas Cry1As son las asas 2 y 3 (Rajamohan *et al.*, 1996). Las mutaciones en estas asas han revelado su importancia en la interacción con la APN (Rajamohan *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2000; Pacheco *et al.*, 2009) y la ALP (Arenas *et al.*, 2010).

En las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab, la región β 16, la cual se localiza en el dominio III, ha sido descrita como el sitio de interacción con la APN1 (Atsumi *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2006) y ALP (Arenas *et al.*, 2010). Dada la identidad compartida entre ambas toxinas (98%) fue posible inferir que ambas interactúan tanto con APN1 como con ALP, tal como se ha demostrado en este proyecto. En el caso particular del dominio III de la toxina Cry1Ac, a diferencia de las otras dos toxinas Cry1As, se localiza un sitio de reconocimiento específico para el azúcar N-acetilgalactosamina (GalNAc) del receptor APN (Burton *et al.*, 1999; Jenkins *et al.*, 1999). Este puede ser el factor determinante que esté afectando la unión de la toxina Cry1Ac con la ALP recombinante, la cual no se encuentra glicosilada, sin embargo aún faltan ensayos para validar esta hipótesis. Otro reto importante para resolver en el futuro es el mapeo de las regiones de las toxinas Cry1As que interactúan con los

receptores anclados por GPI, es importante recordar que la mayor parte de los estudios que exploran las regiones de interacción de las toxinas Cry1As se han realizado con la estructura monomérica de las toxinas, por lo que resultaría interesante resolver cuáles son las regiones de las estructuras oligoméricas de las toxinas Cry1As que interactúan con los receptores anclados por GPI, ya que estas interacciones constituyen un paso importante en el mecanismo de acción propuesto.

El control biológico de insectos plaga en el campo, mediado por las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*, constituye una alternativa viable debido a su especificidad. El mayor riesgo del empleo de estas toxinas es la aparición de insectos resistentes a esta tecnología. Una opción plausible para su aplicación es utilizar 2 o más toxinas que dependan de dos receptores diferentes para disminuir la aparición de resistencia. El empleo de estas toxinas para eliminar insectos plaga que dependan de dos receptores diferentes, como Cry1Ab que depende en mayor medida de ALP, y Cry1Ac que depende de APN1 para ejercer su efecto tóxico, permitiría que no se genere el fenómeno de resistencia cruzada. Este fenómeno consiste en la generación simultánea de resistencia en un mismo organismo a dos toxinas que tienen el mismo modo de acción. La evolución de resistencia cruzada, en insectos susceptibles, no es un fenómeno común ya que requiere de la evolución conjunta de dos genes. La estrategia del empleo de dos toxinas con distintos receptores, promete asegurar menos pérdidas en el campo por un mayor periodo de tiempo.

Los mecanismos de resistencia a la toxina Cry1Ac que han sido reportados en lepidópteros plaga como *H. armigera* (Xu *et al.*, 2005), *H. virescens* (Gahan *et al.*, 2001) y *P. gossypiella* (Morin *et al.*, 2003), están asociados con el receptor tipo caderina. Este receptor ha sido estudiado extensivamente *in vitro*, pero en nuestro organismo de estudio, *M. sexta*, no se ha descrito *in vivo* como participa en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1A. En este proyecto se investigó como es la participación de este receptor en estos mecanismos de toxicidad. Los resultados indican la disminución en mortalidad en larvas de *M. sexta* tratadas con RNA de interferencia de Bt-R1 y son retadas con las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab, sugieren que esta proteína está involucrada en el mecanismo de acción de estas toxinas. Sin embargo, el resultado obtenido con el tratamiento retado con la toxina Cry1Ac, donde hay una mortalidad similar al control alimentado con agua (del 100%), sugiere la posibilidad de la existencia de otro receptor en *M. sexta* que suple la función del receptor tipo caderina, por lo que resultaría interesante investigar cual es este posible receptor.

El conjunto de estos resultados obtenidos con los receptores anclados por GPI, APN y ALP, y el receptor tipo caderina, sugieren que el mecanismo de acción de cada una de las toxinas Cry1As es diferente. Para combatir los mecanismos de resistencia que han aparecido, es necesario comprender a fondo el mecanismo de acción de las toxinas Cry:

conocer cómo están interactuando los receptores con las toxinas, así como identificar las regiones tanto de éstos, como de las toxinas, para ejercer su efecto, con el fin de generar nuevas y mejores estrategias para contender con estos mecanismos de resistencia, sin descartar que pueden existir otras proteínas o moléculas involucradas.

Conclusiones

Las toxinas Cry constituyen una herramienta biotecnológica sobresaliente ya que han sido empleadas extensivamente para manejar y controlar poblaciones de insectos plaga en el campo. Uno de los retos más importantes en la agrobiotecnología es entender cómo funcionan estas toxinas después de ser ingeridas por los insectos susceptibles. Para comprender este proceso, se ha propuesto un modelo para describir el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ab en *M. sexta*. El modelo propone la participación de al menos tres moléculas que funcionan como receptores de estas toxinas. En el presente proyecto, se analizó la participación *in vivo* de dos proteínas ancladas por GPI, APN1 y ALP, las previamente propuestas para participar en el mecanismo de acción de algunas de las toxinas Cry1A en el lepidóptero *M. sexta*. Los resultados obtenidos indican que la fosfatasa alcalina es un participante importante en este proceso. La actividad de unión *in vitro* de esta proteína con las tres toxinas Cry1As, soporta las observaciones que hemos realizado *in vivo*.

De acuerdo con lo observado en este proyecto, se puede concluir que el mecanismo de acción de las toxinas Cry1As puede ser más complejo de como se ha planteado. Cada toxina Cry1A tiene una vía para ejercer su efecto tóxico en *M. sexta*:

- La toxina Cry1Aa requiere tanto del receptor tipo caderina, como de ambos receptores anclados por GPI para ejercer su efecto;
- La toxina Cry1Ab requiere del receptor tipo caderina y en mayor medida de la participación de ALP en su mecanismo de acción, mientras que,
- La toxina Cry1Ac depende de otro receptor que cumple con la función del receptor tipo caderina y del APN1 en su mecanismo de toxicidad.

Estos resultados plantean más preguntas sobre este mecanismo de acción de estas toxinas, las cuales son necesarias de responder para entenderlo mejor y así generar mejores soluciones para contender con los mecanismos de resistencia que aparecen en el campo.

Perspectivas

- Un reto importante por resolver es si la toxina Cry1Ac depende de otro receptor que desempeñe el papel de BtR1 en *M. sexta*. Los resultados indican que esta toxina no requiere de la participación de Bt-R1 en su mecanismo de acción.
- Identificar los sitios de interacción de las toxinas con los receptores constituye una meta que permitiría generar nuevas estrategias en el diseño de mutantes de las toxinas Cry1A más activas, para así contender con la aparición de mecanismos de resistencia asociados a estos dos receptores anclados por GPI.
- Determinar cuáles son las regiones de los receptores anclados por GPI, APN1 y ALP, que interactúan con las estructuras monoméricas y oligoméricas de las toxinas Cry1As. Hay que considerar que en el modelo propuesto para describir la actividad de las toxinas Cry1A, se propone que estas proteínas interactúan con el monómero y oligómero de las toxinas.
- La exploración de nuevas alternativas para estudiar la interacción toxina-receptor, como la expresión heteróloga de los receptores en líneas celulares de insectos. Esta estrategia permitiría disectar el mecanismo de acción de estas toxinas, buscar regiones de interacción importantes de los receptores con las toxinas, y viceversa. Adicionalmente, la línea celular no sería dependiente del ciclo larvario del organismo de estudio.

Referencias bibliográficas

- Alberts B., Johnson A., et al. (2002). Molecular Biology of the Cell, Garland Science.
- Antonov V.K., Vorotyntseva T.I., et al. (1984). "Role of intestinal brush border membrane aminopeptidase N in dipeptide transport." FEBS Letters **171**(2): 227-232.
- Arenas I., Bravo A., et al. (2010). "Role of *alkaline phosphatase* from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin." Journal of Biological Chemistry **285**(17): 12497-12503.
- Atsumi S., Mizuno E., et al. (2005). "Location of the *Bombix mori* aminopeptidase N type 1 binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin." Applied and Environmental Microbiology **71**(7): 3966-3977.
- Baulcombe, D. (2004). "RNA silencing in plants." Nature **431**(7006): 356 -363.
- Baxter S.W., Badenes-Perez F.R., et al. (2011). "Parallel Evolution of *Bacillus thuringiensis* Toxin Resistance in Lepidoptera." Genetics **189** (2): 675-679.
- Boonserm P., Davis P., et al. (2005). "Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications." Journal of Molecular Biology **348**(2): 363-382.
- Boonserm P., Mo M., et al. (2006). "Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution." Journal of Bacteriology **188**(9): 3391-33401.
- Bradford M. M (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal. Biochem. **72**: 248-254.
- Bravo A., Gómez I., et al. (2004). "Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains." Biochimica et Biophysica Acta **1667**(1): 38-46.
- Bravo A., Likitvivanavong S., et al. (2011). "*Bacillus thuringiensis*: A story of a succesful bioinsecticide." Insect Biochemistry and Molecular Biology **41**(7): 423-431.
- Burton S. L., Ellar D. J., et al. (1999). "N-Acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin." J. Mol. Biol. **287**(5): 1011–1022.
- Chen J., Aimanova K. G., et al. (2009). "Aedes aegypti cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis." Biochemical Journal **424**(1): 191–200.
- Chen J., Brown M. R., et al. (2005). "Comparison of the localization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A delta-endotoxins and their binding proteins in larval midgut of tobacco hornworm, *Manduca sexta*." Cell Tissue Research **321**(1): 123-129.
- Daniel A. and Adang M.J *Manduca sexta* aminopeptidase N. Datos sin publicar.
- Daniel A., Hua G., et al. Sugar-independent recognition of a novel *Manduca sexta* aminopeptidase N by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. Datos sin publicar.
- Dechklar M., Tiewsi K., et al. (2011). "Functional expression in insect cells of

- glycosylphosphatidylinositol-linked alkaline phosphatase from *Aedes aegypti* larval midgut: A *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptor." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **41**(3): 159-166.
- Denolf P., Hendrickx K., et al. (1997). "Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins." *European Journal of Biochemistry* **248**(3): 748-761.
- Dorsch J. A., Candas M., 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 Biochemistry and Molecular Biology* **32**(9): 1025–1036.
- Du C., Martin P. A. W., et al. (1994). "Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals." *Applied and Environmental Microbiology* **60**(10): 3847-3853.
- Eguchi M (1995). "Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **111**(2): 151-162.
- EPA. (2010). www.epa.gov "Principios del Manejo Integrado de Plagas."
- Fabrick J., Oppert C., et al. (2009). "A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin." *Journal of Biological Chemistry* **284**(27): 1807 - 18410.
- Fernandez-Luna M. T., Lanz-Mendoza H., et al. (2010). "An α -amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae)." *Environmental Microbiology* **12**(3): 746-757.
- Fire A (2007). "Gene Silencing by Double-Stranded RNA (Nobel Lecture)." *Angewandte Chemie International Edition* **46**(37): 6966 - 6984.
- Fire A., Xu S., et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **391**(6669): 806-811.
- Flannagan R. D., Yu C. G., et al. (2005). "Identification, cloning and expression of a Cry1Ab cadherin receptor from European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae)." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **35**(1): 33-40.
- Francis B. R. and Bulla L. A. Jr (1997). "Further characterization of BT-R1, the cadherin-like receptor for Cry1Ab toxin in tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midguts." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **27**(6): 541-550.
- Gahan L. J., Gould F., et al. (2001). "Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens* ." *Science* **293**(5531): 857 -860.
- Gahan L. J., Pauchet Y., et al. (2010). "An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin." *PLOS Genetics* **6**(12): e1001248.
- Galitsky N., Cody V., et al. (2001). "Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*." *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **57**(8): 1101-1109.
- Garczynski S. F., Crim J. W., et al. (1991). "Identification of putative insect brush

- border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* - endotoxin by protein blot analysis. ." Applied and Environmental Microbiology **57**: 2816-2820.
- Gill M. and Ellar D. J (2002). "Transgenic *Drosophila* reveals a functional *in vivo* receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1." Insect Molecular Biology **11**(6): 619-625.
- Gilliland A., Chambers C., et al. (2002). "Role of *Bacillus thuringiensis* Cry1 δ Endotoxin Binding in Determining Potency during Lepidopteran Larval Development." Applied and Environmental Microbiology **68**(4): 1509-1515.
- Gómez I., Arenas I., 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*." Journal of Biological Chemistry **281**(45): 34032–34039.
- Gómez I., Sánchez J., et al. (2002). "Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix a-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin." FEBS Letters **513**(2): 242 - 246.
- Gonzales T. and Robert-Baudouy J (1996). "Bacterial aminopeptidases: properties and functions." FEMS Microbiology Reviews **18** (4): 319-344.
- Griffitts J. S., Haslam S. M., et al. (2005). "Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin." Science **307**(5711): 922- 925.
- Grochulski P., Masson L., et al. (1995). "*Bacillus thuringiensis* CryIA(a) Insecticidal Toxin: Crystal Structure and Channel Formation." Journal of Molecular Biology **254**(3): 447-464.
- Guo S., Ye S., et al. (2009). "Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*." Journal of Structural Biology **168**(2): 259-266.
- Hara H., Atsumi S., et al. (2003). " A cadherin-like protein functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa and Cry1Ac toxins on midgut epithelial cells of *Bombyx mori* larvae. ." FEBS Letters **538**(1-3): 29-34.
- Herrero S., Gechev T., et al. (2005). "*Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes." BMC Genomics **6**: 96.
- Höck J. and Meister G (2008). "The Argonaute protein family." Genome Biology **9**(2): 210 - 218.
- Hua G, Zhang R., et al. (2008). "*Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity." Biochemistry **47**(18): 5101–5110.
- Hua G., Jurat-Fuentes J. L., et al. (2004). "Fluorescent-based assays establish *Manduca sexta* Bt-R1a cadherin as a receptor for multiple *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins in *Drosophila* S2 cells." Insect Biochemistry and Molecular Biology **34**(3): 93–202.
- Hua G., Tsukamoto K., et al. (1998). "Molecular cloning of a GPI-anchored aminopeptidase N from *Bombyx mori* midgut: a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA toxin." Gene **214**(1-2): 177-185.
- Hua G., Zhang R., et al. (2009). "*Anopheles gambiae* alkaline phosphatase is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis jegathesan* Cry11Ba toxin." Biochemistry **48**(41): 9785-9793.

- Huang F., Leonard B. R., et al. (2007). "Sugarcane Borer (Lepidoptera: Crambidae) Resistance to Transgenic *Bacillus thuringiensis* Maize." Journal of Economic Entomology **100**(1): 164-171.
- Hui F., Scheib U., et al. (2012). "Structure and Glycolipid Binding Properties of the Nematicidal Protein Cry5B." Biochemistry **51**(49): 9911-9921.
- Huvenne H. and Smaghe G (2010). "Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review." Journal of Insect Physiology **56**(3): 227–235.
- Huynh C. Q. and Zieler H. (1999). "Construction of Modular and Versatile Plasmid Vectors for the High-level Expression of Single or Multiple Genes in Insects and Insect Cell Lines." J. Mol. Biol. **288**: 13-20.
- Ibiza-Palacios M. S., Ferré J., et al. (2008). "Selective inhibition of binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to cadherin-like and aminopeptidase proteins in brush-border membranes and dissociated epithelial cells from *Bombyx mori*." Biochemical Journal **409**(1): 215–221.
- Ibrahim M. A., Griko N., et al. (2010). "*Bacillus thuringiensis* A genomic and proteomics perspective." Bioengineered Bugs **1**(1): 31-50.
- Itoh M., Inoue T., et al. (2003). "Tandem duplication of alkaline phosphatase genes and polymorphism in the intergenic sequence in *Bombyx mori*." Molecular Genetics Genomics **270**(3): 114-120.
- Jenkins J. L., Lee M. K., et al. (1999). "Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin to *Manduca sexta* aminopeptidase- N receptor is not directly related to toxicity." FEBS Letters **462**: 372-376.
- Jose A. M. and Hunter C. P (2007). "Transport of sequence-specific RNA interference information between cells." Annual Review of Genetics **41**: 305–330.
- Jurat-Fuentes J. L. and Adang M. J (2004). "Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae." European Journal of Biochemistry **271**(15): 3127-3135.
- Jurat-Fuentes J. L. and Adang M. J (2006). "The *Heliothis virescens* cadherin protein expressed in *Drosophila* S2 cells functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A but Not Cry1Fa Toxins." Biochemistry **45**(32): 9688-9695.
- Jurat-Fuentes J. L., Gould F. L., et al. (2002). "Altered Glycosylation of 63- and 68-Kilodalton Microvillar Proteins in *Heliothis virescens* Correlates with Reduced Cry1 Toxin Binding, Decreased Pore Formation, and Increased Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1 Toxins." Applied and Environmental Microbiology **68**(11): 5711–5717.
- Jurat-Fuentes J. L., Karumbaiah L., et al. (2011). "Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*." PLoS One **6**(3): e17606.
- Knight P. J. K., Crickmore N., et al. (1994). "The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N." Molecular Microbiology **11**(3): 429-436.
- Laemmli U. K (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(680-685).

- Lee M. K., Rajamohan F., et al. (2000). "Role of two arginine residues in domain II, loop 2 of Cry1Ab and Cry1Ac *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin in toxicity and binding to *Manduca sexta* and *Lymantria dispar* aminopeptidase N." Molecular Microbiology **38**(2): 289-298.
- Lee M. K., You T. H., et al. (1999). "Identification of residues in domain III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin that affect binding and toxicity." Applied and Environmental Microbiology **65**(10): 4513-4520.
- Lee M. K., You T. H., et al. (1996). "Aminopeptidase N purified from gypsy moth Brush Border Membrane Vesicles is a specific receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin." Applied and Environmental Microbiology **62**(8): 2845-2849.
- Li J. D., Carroll J., et al. (1991). "Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution." Nature **353**(6347): 815-821.
- Luo K., McLachlin J. R., et al. (1999). "Expression of a glycosylphosphatidylinositol-linked *Manduca sexta* aminopeptidase N in insect cells." Protein Expr. Purif. **17**(1): 113-122.
- Luo K., Sangadala S., et al. (1997). "The *Heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase functions as "receptor A" by mediating specific *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ -endotoxin binding and pore formation." Insect Biochemistry and Molecular Biology **27**: 735-743.
- Martins E. S., Monnerat R. G., et al. (2010). "Midgut GPI-anchored proteins with alkaline phosphatase activity from the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) are putative receptors for the Cry1B protein of *Bacillus thuringiensis*." Insect Biochemistry and Molecular Biology **40**(2): 138-145.
- Masson, L., Lu Y. J., et al. (1995). "The Cry1A(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities." Journal of Biological Chemistry **270**(35): 20309-20315.
- McNall R. J. and Adang M.J (2003). "Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis." Insect Biochemistry and Molecular Biology **33**(10): 999-1010.
- Meng J., Candas M., et al. (2001). "Expression in *Spodoptera frugiperda* (Sf21) Insect Cells of BT-R1, a cadherin-related receptor from *Manduca sexta* for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin." Protein Expression and Purification **22**(1): 141-147.
- Mesnage R., Clair E., et al. (2011). "Cytotoxicity on human cells of Cry1Ab and Cry1Ac Bt insecticidal toxins alone or with a glyphosate-based herbicide." Journal of Applied Toxicology **33**: 695-699.
- Midboe E. G., Candas M., et al. (2003). "Expression of a midgut-specific cadherin BT-R₁ during the development of *Manduca sexta* larva." Comparative Biochemistry and Physiology Part B **135**(1): 125-137.
- Morin S., Biggs R. W., et al. (2003). "Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm." Proceedings of the National Academy of Science **100**(9): 5004-5009.
- Morse R. J., Yamamoto T., et al. (2001). "Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope." Structure **9**(5): 409-417.
- Muñoz-Garay C., Sánchez J., et al. (2006). "Permeability changes of *Manduca sexta* midgut brush border membranes induced by oligomeric structures of

- different cry toxins." Journal of Membrane Biology. **212**(1): 61 - 68.
- Nagamatsu Y., Koikea T., et al. (1999). "The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin." FEBS Letters **460**(2): 385-390.
- Nagamatsu Y., Toda S., et al. (1998). "Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **62**(4): 727-734.
- Nakanishi K., Yaoi K., et al. (2002). "Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella*—their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin." FEBS Letters **519**(1-3): 215-220.
- Ning C., Wu K., et al. (2010). "Characterization of a Cry1Ac toxin-binding alkaline phosphatase in the midgut from *Helicoverpa armigera* (Hübner) larvae." Journal of Insect Physiology **56**(6): 666-672.
- Pacheco S., Gómez I., et al. (2009). "Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a "ping pong" binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors." Journal of Biological Chemistry **284**(47): 32750-32757.
- Pardo - López L., Soberón M., et al. (2013). "*Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection." FEMS Microbiology Reviews **37**(1): 3-22.
- Pardo-López L., Gómez I., et al. (2006). "Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion." Biochemistry **45**(34): 10329 -10336.
- Park Y., Abdullah M. A., et al. (2009). "Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa and Cry3Bb toxicities to coleopteran larvae by a toxin-binding fragment of an insect cadherin." Applied and Environmental Microbiology **75**(10): 3086-3092.
- Pauchet Y., Wilkinson P., et al. (2010). "Pyrosequencing the *Manduca sexta* larval midgut transcriptome: messages for digestion, detoxification and defence." Insect Biochemistry and Molecular Biology **19**(1): 61-75.
- Perera O. P., Willis J. D., et al. (2009). "Cloning and characterization of the Cry1Ac-binding alkaline phosphatase (HvALP) from *Heliothis virescens*." Insect Biochemistry and Molecular Biology **39**(4): 294-302.
- Perrimon N., Ni J. Q., et al. (2010). "In vivo RNAi: today and tomorrow." Cold Spring Harb Perspect Biol. **2**(8): a003640.
- Pigott C. R. and Ellar D. J (2007). "Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity." Microbiology and Molecular Biology Reviews **71**(2): 255 -281.
- Rahman M. M., Roberts H. L. S., et al. (2003). "Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella*." Proceedings of the National Academy of Science **101**(9): 2696-2699.
- Rajagopal R., Sivakumar S., et al. (2002). "Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor." Journal of Biological Chemistry **277**(49):

46849–46851.

- Rajamohan F., Cotrill J. A., et al. (1996). "Role of domain II, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* CryIAb δ -endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*." Journal of Biological Chemistry **271**: 2390-2396.
- Rodríguez Chamorro D (2013). Identificación de los receptores de la toxina Cry1Ca de *Bacillus thuringiensis* en el intestino de *Spodoptera frugiperda*. Instituto de Biotecnología. Cuernavaca, Morelos, Universidad Nacional Autónoma de México. **Maestría**: 68.
- Rukmini V., Reddy C. Y., et al. (2000). "*Bacillus thuringiensis* crystal δ - endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin." Biochimie **82**(2): 109-116.
- SAGARPA. (2012). www.sagarpa.gob.mx "Manejo Integrado de Plagas."
- Sanahuja G., Raviraj B., et al. (2011). "*Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and comercial applications." Plant Biotechnology Journal **9**(3): 283-300.
- Sangadala S., Walters F. S., et al. (1994). "A mixture o *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticididad CryIA(c) toxing binding and $^{86}\text{RB}^+$ - K^+ efflux *in vitro*." Journal of Biological Chemistry **269**(13): 10088-10092.
- Sauka D. H. and Benitende G. B (2008). "*Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidóperos que son plagas agrícolas." Revista Argentina de Microbiología **40**(2): 124-140.
- Schnepf E., Crickmore N., et al. (1998). "*Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins." Microbiology Molecular Biology Review **62** (3): 775–806.
- Siegel J.P (2000). Bacteria. Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. L. L. Lacey and H. K. Kaya. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Scientific Publishers: 209 - 230.
- Siegel J.P (2001). "The Mammalian Safety of *Bacillus thuringiensis*-Based Insecticides." Journal of Invertebrate Pathology **77**: 13-21.
- Siomi H. and Siomi M. C (2009). "On the road to reading the RNA-interference code." Nature **457**(7228): 396-404.
- Soberón M., Pardo-López L., et al. (2007). "Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance." Science **318**(5856): 1640-1642.
- Tabashnik B. E., Huang F., et al. (2011). "Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance." Nature Biotechnology **29**(12): 1128-1131.
- 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*." Journal of Cell Science **60**: 181-197.
- Tiewsiriri K. and Wang P (2011). "Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper." Proceedings of the National Academy of Science **108**(34): 14037–14042.
- Timmons L. and Fire A (1999). "Specific interference by ingested dsRNA." Nature **395**(6705): 854.
- Tsuda Y., Nakatani F., et al. (2003). "Cytotoxic activity of *Bacillus thuringiensis* Cry

- proteins on mammalian cells transfected with cadherin-like Cry receptor gene of *Bombyx mori* (silkworm)." Biochemical Journal **369**(Pt. 3): 697 - 703.
- Vadlamudi R. K., Weber E., et al. (1995). "Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*." Journal of Biological Chemistry **270**(10): 5490-5494.
- Valaitis A. P., Mazza A., et al. (1997). "Interaction analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with two aminopeptidases from gypsy moth midgut brush border membranes." Insect Biochemistry and Molecular Biology **27**(6): 529-539.
- Wang P., Zhang X., et al. (2005). "Molecular characterization of four midgut aminopeptidase N isozymes from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*." Insect Biochemistry and Molecular Biology **35**(6): 611-620.
- Whalon M. E. and Wingerd B. A (2003). "Bt: Mode of action and use " Archives of Insect Biochemistry and Physiology **54**: 200-211.
- Wolfersberger M. G (1993). "Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the gypsy moth (*Lymantria dispar*)." Arch. Insect. Biochem. Physiol. **24**: 139-147.
- Xie R., Zhuang M., et al. (2005). "Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. ." Journal of Biological Chemistry **280**(9): 8416–8425.
- Xu X., Yu L., et al. (2005). "Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac d-dendotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*." Applied and Environmental Microbiology **71**(2): 948-953.
- Yang Y., Zhu Y. C., et al. (2010). "Molecular characterization and RNA interference of three midgut aminopeptidase N isozymes from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and -resistant strains of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*." Insect Biochemistry and Molecular Biology **40**(8): 592-603.
- Yang Y., Zhu Y. C., et al. (2011). "Down regulation of a gene for cadherin, but not alkaline phosphatase, associated with Cry1Ab resistance in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*." PLOS One **6**(10): e25783.
- Yang Z. X., Wu Q. J., et al. (2012). "Expression of cadherin, aminopeptidase N and alkaline phosphatase genes in Cry1Ac-susceptible and Cry1Ac-resistant strains of *Plutella xylostella* (L.)." Journal of Applied Entomology **136**: 539-548.
- Yaoi K., Kadotani T., et al. (1997). "Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin." European Journal of Biochemistry **246**(3): 652-657.
- Zavala L. E., Pardo-López L., et al. (2011). "Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin remain exposed to the solvent after insertion of part of domain I into the membrane." Journal of Biological Chemistry **285**(21): 19109-19117.
- Zhang S., Hongmei C., et al. (2009). "Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin." Insect Biochemistry and Molecular Biology **39**(7): 421-429.
- Zhang X., Candas M., et al. (2005). "Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab

toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells." Cell Death Differentiation **12**(1): 1407–1416.

Zhang X., Candas M., et al. (2006). "A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*." Proceedings of the National Academy of Science **103**(26): 9897-9902.

Anexo 1. Publicación derivada directamente de este proyecto.

Differential Role of *Manduca sexta* Aminopeptidase-N and Alkaline Phosphatase in the Mode of Action of Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac Toxins from *Bacillus thuringiensis*.

Flores-Escobar B., Rodríguez-Magadan H., Bravo A., Soberón M., Gómez I. 2013
Applied and Environmental Microbiology. 79:4543-4550.

Articles of Significant Interest Selected from This Issue by the Editors

Differential Roles of GPI-Anchored Proteins in Cry1A Toxin Mode of Action

In the mode of action of Cry1A toxins, it has been suggested that alkaline phosphatase (ALP) and aminopeptidase-N (APN) could have redundant roles in Cry1A toxicity. Flores-Escobar et al. (p. 4543–4550), using *Manduca sexta* silenced larvae, examined the role of APN and ALP proteins in Cry1A toxicity. Their results suggest that the two GPI-anchored proteins have different roles in Cry1A toxicity. To exert its insecticidal effect, *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* produces three different Cry1A toxins that, in conjunction, target diverse midgut proteins.

Autoaggregation as a Sortase-Dependent Adhesive Mechanism of Vaginal *Lactobacillus* Species

The human vagina is generally dominated by lactobacilli under healthy conditions. However, molecular insights into the adaptation of lactobacilli to this niche have been lacking. By functional analysis of a mutant lacking the housekeeping sortase enzyme, Malik and colleagues (p. 4576–4585) show a crucial role for sortase-dependent tagging of proteins in attributing high autoaggregativeness and adhesiveness to the vaginal *Lactobacillus plantarum* CPMG5300 strain. This study suggests that the use of knockout mutants can greatly increase our understanding of the molecular mechanisms underlying the adaptation and beneficial actions of vaginal lactobacilli.

Specific Association of *Saccharomyces cerevisiae* Killer Toxin-Encoding M Satellite Double-Stranded RNAs and Their Helper L-A Totivirus Is Indicative of Coevolution

Killer toxins produced by double-stranded RNA (dsRNA) satellites of the *Saccharomyces cerevisiae* L-A totivirus are widely distributed in nature, conferring to the host yeast a selective advantage. Here, Rodríguez-Cousiño et al. (p. 4661–4674) report that 23% of the nucleotides of the helper virus (L-A-lus) of a new killer toxin-encoding dsRNA, Mlus, are distinct from those of L-A. In a screening of 31 killer yeast strains, L-A-lus was found to be associated with toxin-encoding Klus dsRNA whereas K2 killer strains carry another L-A variant (L-A-2). The divergence of the L-A sequences in different killer toxin-producing yeast strains suggests that the satellite RNAs may have played a role in the evolution of their helper viruses, with selection mainly of those variants that can maintain the killer phenotype.

Attach, Breathe, and Move: Microbial Survival in Hot, Iron-Rich Hydrothermal Sediments

The microbial reduction of Fe(III) plays an important role in the geochemistry of hydrothermal systems, yet it is poorly understood at the mechanistic level. By studying the obligate Fe(III)-reducing archaeon *Geoglobus ahangari*, Manzella et al. (p. 4694–4700) demonstrate the environmental relevance of a strong association with Fe(III) mineral particles for efficient electron transfer and of using flagellar motility to access reactive ferric minerals that are continuously being deposited as a dispersed layer on top of the hot sediments around hydrothermal vents. This dual strategy maximizes the fitness of microorganisms growing under the extreme physical and chemical conditions of hydrothermal systems.

“Run-Reverse-Turn” Mechanism for *Pseudomonas* Motility Revealed through a Novel Tethering Analysis

In contrast to investigations of the motility of peritrichous bacteria, it has been challenging to study the motility of polar-flagellated bacteria in cell tethering assays due to their unstable rotational trajectories. Qian and colleagues (p. 4734–4743) have developed a novel bacterial tethering analysis program that corrects for these effects computationally. Using this program to study polar-flagellated *Pseudomonas* spp., they found that the *Pseudomonas* flagellar motor has an additional “pause” phase during which the cell stops and turns at large angles. Pause durations and, consequently, turn angles were shown to be regulated during chemotaxis. These results revealed that *Pseudomonas* spp. use a novel “run-reverse-turn” mechanism to swim and undergo chemotaxis.

Differential Role of *Manduca sexta* Aminopeptidase-N and Alkaline Phosphatase in the Mode of Action of Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac Toxins from *Bacillus thuringiensis*

Biviana Flores-Escobar,^a Hector Rodríguez-Magadan,^b Alejandra Bravo,^a Mario Soberón,^a Isabel Gómez^a

Departamento de Microbiología Molecular^a and Departamento de Genética del Desarrollo y Biología Molecular,^b Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

Aminopeptidase-N (APN1) and alkaline phosphatase (ALP) proteins located in the midgut epithelium of *Manduca sexta* have been implicated as receptors for Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac insecticidal proteins produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. In this study, we analyzed the roles of ALP and APN1 in the toxicity of these three Cry1A proteins. Ligand blot analysis using brush border membrane vesicles of *M. sexta* showed that Cry1Aa and Cry1Ab bind preferentially to ALP during early instars while binding to APN was observed after the third instar of larval development. Cry1Ac binds to APN throughout all larval development, with no apparent binding to ALP. ALP was cloned from *M. sexta* midgut RNA and expressed in *Escherichia coli*. Surface plasmon resonance binding analysis showed that recombinant ALP binds to Cry1Ac with 16-fold lower affinity than to Cry1Aa or Cry1Ab. Downregulation of APN1 and ALP expression by RNA interference (RNAi) using specific double-stranded RNA correlated with a reduction of transcript and protein levels. Toxicity analysis of the three Cry1A proteins in ALP- or APN1-silenced larvae showed that Cry1Aa relies similarly on both receptor molecules for toxicity. In contrast, RNAi experiments showed that ALP is more important than APN for Cry1Ab toxicity, while Cry1Ac relied principally on APN1. These results indicated that ALP and APN1 have a differential role in the mode of action of Cry1A toxins, suggesting that *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* produces different Cry1A toxins that in conjunction target diverse midgut proteins to exert their insecticidal effect.

Cry toxins produced by *Bacillus thuringiensis* are pore-forming toxins that have been used worldwide in the control of insect pests in agriculture, either in transgenic crops or as spray formulations (1–3). Their mechanism of action is complex and involves several steps. In the case of lepidopteran-active Cry1A proteins, it has been proposed that protease-activated toxins first bind to highly abundant glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored alkaline phosphatase (ALP) or aminopeptidase-N (APN) proteins as a mechanism to bring the toxins close to the insect midgut epithelium. Then, the toxins could bind to the cadherin protein with high affinity. This interaction induces further proteolytic cleavage of the amino-terminal end of the toxin, including the helix α -1 region of domain I, leading to toxin oligomerization (4, 5). Finally, the Cry1A oligomers gain affinity to APN or ALP and bind again to these receptors, leading to the insertion of the oligomeric structure into the membrane forming ionic pores, causing osmotic lysis of midgut epithelial cells and insect death (6–8). Although this mechanism of action is generally accepted, the role of the two GPI-anchored proteins in the toxicity of different Cry1A toxins remains to be determined (9).

B. thuringiensis subsp. *kurstaki* produces several Cry1A toxins, such as Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac, and also the less related Cry2Aa. Cadherin and APN1 Cry1A receptor molecules have been cloned, heterologously expressed, and shown to bind Cry1A proteins by ligand blot analysis (6). Although functional proof for cadherin as a Cry1A protein receptor has been demonstrated by cytolysis of insect cells expressing *Manduca sexta* cadherin protein and by gene silencing of cadherin expression by RNA interference (RNAi) (10–13), a similar characterization of APN-Cry1A interaction has not yet been done. However, compelling evidence that lepidopteran APN is a functional receptor for Cry1A comes from studies by Gill and Ellar, who expressed *M. sexta* APN1 in *Dro-*

sophila melanogaster and demonstrated that the transgenic flies acquired sensitivity to Cry1Ac (14). Also, the functional relevance of APN of *Spodoptera litura* for Cry1C toxicity was demonstrated by an APN silencing strategy using RNAi (15). Nevertheless, some Cry1Ac mutants affected in binding to APN1 showed a marginal effect on toxicity against *M. sexta* larvae, suggesting that other Cry1Ac binding proteins may be involved in Cry1Ac toxicity (16). In the case of *Bombyx mori*, it was shown that anticadherin antibodies protected detached midgut cells from the toxic effects of Cry1Aa, in contrast to anti-APN antibodies, which had no effect on the toxicity of this toxin (17). These apparently contradictory data could be explained if an additional secondary receptor could play the same role as APN in midgut cells. In this regard, a GPI-anchored ALP was also identified as a receptor for Cry1Ac toxin in different lepidopteran species (18). Recently, we showed that a mutant of Cry1Ab toxin affected in binding to ALP was not toxic to *M. sexta* larvae, supporting the role of this receptor in toxicity (1, 7).

Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac exhibit similar toxicities toward *M. sexta* larvae and show high degrees of sequence and presumed structural identities (19). The three toxins share almost identical domain I amino acid sequences, with 97 to 98% identity, but show

Received 2 April 2013 Accepted 13 May 2013

Published ahead of print 17 May 2013

Address correspondence to Isabel Gómez, isabelg@ibt.unam.mx.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01062-13>.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.01062-13

differences in amino acid sequences in domains II and III. Cry1Aa and Cry1Ab share 97% identity in the amino acid sequence of domain III but only 71% domain II sequence identity. Specifically, the domain II loop regions, which are involved in receptor interaction, show low amino acid similarity. In contrast, Cry1Ac and Cry1Ab share 98% identity in the amino acid sequence of domain II but only 45% sequence identity in domain III. Domain I is a seven- α -helix bundle involved in membrane insertion, oligomerization, and pore formation, while domains II and III, principally composed of beta-sheets, are involved in receptor interaction. Interestingly, Cry1Ac domain III contains an *N*-acetylgalactosamine binding pocket that has been shown to be crucial for APN1 binding (16, 20). Thus, differences in amino acid sequence identities of domain II and domain III among the three Cry1A toxins could determine different capabilities of binding to the diverse receptor molecules. To determine the role of both APN1 and ALP proteins in the toxicity of the three Cry1A toxins described above, we analyzed the binding properties of recombinant expressed ALP and analyzed the effect of downregulation of ALP and APN1 gene expression on the toxicity of these Cry toxins. Our results show that ALP and APN1 have a differential role in the mode of action of Cry1A toxins from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

MATERIALS AND METHODS

Toxin expression and proteolytic activation. The acrylamide strain 407cry⁻ (21) transformed with pHT409 (22) harboring the *cry1Aa* gene or pHT315-1Ab harboring the *cry1Ab* gene was used for Cry1Aa and Cry1Ab production. Cry1Ac was produced from the wild-type *B. thuringiensis* strain HD73. Crystals of proteins were produced in *B. thuringiensis* transformant strains grown for 3 days at 29°C in nutrient broth sporulation medium (23). The crystal inclusions were purified from sporulated *B. thuringiensis* cultures using discontinuous sucrose gradients (24). The crystals were solubilized in 50 mM Na₂CO₃-NaHCO₃ buffer containing 0.02% mercaptoethanol, pH 10.5, at 37°C for 2 h. The solubilized protoxins were centrifuged for 10 min at 14,000 rpm to remove insoluble material and stored at 4°C. For proteolytic activation, the solubilized protoxins were digested with 1:50 trypsin (Sigma) at 37°C for 2 h. Protein concentration of protoxins and toxins was determined by the Bradford method using bovine serum albumin (BSA) as a standard (25).

Bioassays. Different doses of pure crystals (from 0.1 to 50 ng/cm²) were applied onto the artificial diet surface of 24-well polystyrene plates (cell wells; Corning). One first-instar *M. sexta* larva was used per well, and 24 larvae were assayed per toxin concentration in three repetitions. Mortality was recorded after 7 days, and the 50% lethal concentration (LC₅₀) was estimated by using Probit analysis (Polo-PC; LeOra Software).

BBMV preparation and Western blotting. Brush border membrane vesicles (BBMVs) were prepared from dissected midgut tissue of each instar of *M. sexta* larvae by following the protocol described by Wolfersberger (26). We resolved 2.5 μ g of protein of BBMV isolated from the different larval instars in 9% SDS-PAGE gels, and then proteins were electrotransferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane from Millipore. Blots were blocked with 5% nonfat dry milk in phosphate-buffered saline (PBS)-0.1% Tween 20 (PBST) and incubated with 1:30,000 anticadherin, 1:25,000 anti-APN, or 1:5,000 anti-ALP antibodies in PBST. Subsequently, blots were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:30,000) in PBST from Santa Cruz and developed with luminol (Pierce) as indicated by the manufacturer.

Ligand blot analysis. Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac toxins were biotinylated using biotinamido caproate *N*-hydroxysuccinimide ester (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Membrane preparations containing 2.5 μ g of protein of BBMV from each

instar were resolved in 9% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. After blocking of the membrane in PBS buffer supplemented with 2% bovine serum albumin (bovine serum albumin fraction V; Roche), 5 nM Cry1A biotinylated toxin was added and the membrane was incubated for 1 h at room temperature. The blots were then washed twice with PBST and overlaid with streptavidin-horseradish peroxidase (Amersham) for 1 h. After three washes with PBST, the blot was developed with luminol (Pierce) as indicated by the manufacturer.

Cloning of alkaline phosphatase and heterologous expression from *M. sexta* larval gut tissue. Total RNA from second-instar larval midguts of *M. sexta* was extracted using an RNeasy minikit (Qiagen). The 5' and 3' flanking regions of the *alp* gene were obtained by 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) using a GeneRacer kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Primers were designed based on a larval midgut ALP expressed sequence tag (EST) of 1,193 nucleotides (nt) generated using 454 pyrosequencing (GenBank accession no. GR922057.1) (27). The 1,600-bp PCR product was subcloned into the TOPO vector (Invitrogen) and transformed into *E. coli* TOP10 cells (Invitrogen), and plasmids from transformants were purified and sequenced in the DNA sequencing facility of Instituto de Biotecnología-UNAM. *M. sexta* alkaline phosphatase (MsALP) was subcloned into the pET22b expression vector (Novagen) using PCR primers designed with EcoRI and HindIII restriction sites at the 5' and 3' ends, respectively. pET22b plasmid was selected since it adds a His tag at the C-terminal end of the protein. To ensure proper protein expression, the coding frame in transformants was verified by DNA sequencing in the forward and reverse directions.

For protein expression and purification of MsALP, the pET22b plasmid with MsALP was transformed into *E. coli* strain BL21(DE3). Transformants were grown overnight with constant agitation at 37°C in 5 ml of LB broth containing 50 μ g/ml of ampicillin. The following morning, 100 μ l of this overnight culture was used to inoculate 100 ml of 2 \times TY broth (in 1 liter: 10 g Bacto yeast extract, 16 g Bacto tryptone, 5 g NaCl) supplemented with 100 μ g/ml of ampicillin in a 250-ml flask. This culture was incubated at 37°C with constant agitation until an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.7 was reached, and expression of MsALP was induced by addition of 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG; Sigma) for 5 h at 30°C. After this period, 200 μ l of the culture was removed and mixed with Laemmli sample buffer (28), 15- μ l aliquots were separated on a 12% SDS-PAGE gel, and expression of the MsALP clone was confirmed using Coomassie blue staining. For MsALP protein purification, cells were pelleted by centrifugation (5,000 rpm for 15 min at 4°C) and the pellet was suspended in STE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 8 M urea [pH 8]). After sonication for 5 min on ice, cell debris was eliminated by centrifugation (70,000 rpm for 30 min at 15°C), and the supernatant was subjected to affinity purification using Ni-agarose beads (Qiagen). After a washing with 35 mM imidazole in PBS buffer (pH 7.5), the recombinant protein was eluted with 250 mM imidazole and gradually dialyzed against PBS buffer. The purified proteins were separated by 12% SDS-PAGE, and concentrations were measured as described above. Purified protein was used as antigen to develop antiserum to MsALP. A New Zealand White rabbit was immunized subcutaneously three times with 1 mg of MsALP, which had been mixed with incomplete Freund's adjuvant, at 15-day intervals. The serum was recovered 40 days after the primary immunization. A similar procedure was used to obtain anticadherin and anti-APN antibodies.

Biosensor analysis of Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac toxin affinities. A SensiQ instrument (ICX Nomadics) was programmed to conduct surface plasmon resonance (SPR) experiments and kinetic analysis. The sensogram was recorded as a plot of binding response (resonance unit) versus time. All the sensograms were processed using the double reference method to eliminate the nonspecific binding from background contribution and buffer artifacts by subtracting signals from the reference flow cell and from buffer blank injections. Purified MsALP protein was immobilized onto a COOH sensor (ICX Nomadics) by conventional amine cou-

TABLE 1 Primers used to amplify APN and ALP regions for dsRNA synthesis and for qPCR^a

Region	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')
APN1	CGACAAC <u>TCGAGG</u> TCGCCGAACCCTACCAC	GTCAATGACTCTAGACTGTCCAGTCATAAC
ALP	GTTGTTCAAGCTTCTGGCCTGCGGATCGCGACG GCAGAGGATGT	CCGTCCATCTAGATGACTCCGTACTTAGTCTTCACTCC AGTCAAG
qAPN	CGACAAC <u>TCGAGG</u> TCGCCGAACCCTACCAC	CATCTTGCCTGAACGAGAGTCATACGGCCG
qALP	GTTGTTCAAGCTTCTGGCCTGCGGATCGCGACG GCAGAGGATGT	TTTCTCCTGGAGCTTGGCGTTACAGCGCTGC
RPS3	GTGTCAACCCTACCCGATCGGAGATCATCA	ATCTCAAAGACTCGGCCTGAGCGATGGCGC

^aRestrictions sites used for cloning in pLITMUS 28i plasmid are underlined.

pling. The running buffer for all experiments was HBS buffer, pH 7.4, containing 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, and 0.005% (vol/vol) Tween 20. Running buffer was freshly prepared, filtered (pore size of 0.22 μ m), and degassed. Serial doubling dilutions from 0 to 100 nM Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac were injected in randomized orders, and the surface was then regenerated with a 1-min injection of 20 mM NaOH. The data for all binding proteins were analyzed and fitted to 1:1 Langmuir binding, and binding constants were calculated using SensiQ software, version B.02, supplied by ICX Nomadics.

Reverse transcription and dsRNA synthesis. Total RNA was extracted using an RNeasy minikit (Qiagen). The quantity and quality of RNA were determined spectrophotometrically using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). cDNA was synthesized from 1 μ g of total RNA using a SuperScript III reverse transcriptase kit (Invitrogen Life Technologies), by following the manufacturer's instructions. The cDNA was stored at -80°C prior to further analysis. A 308-bp internal fragment of *apn1* and 434 bp for *alp* were obtained by PCR using the primers indicated in Table 1. The truncated fragments of *M. sexta apn1* and *alp* were subcloned into pLITMUS 28i vector (New England BioLabs) and used for the preparation of double-stranded RNA (dsRNA). dsRNA was prepared with a TranscriptAid T7 high-yield transcription kit (Fermentas, Life Sciences) according to the manufacturer's protocols. Purified dsRNA was stored at -20°C until use.

Knockdown of APN1 and ALP using RNA interference and their effect on toxicity with Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac toxins. Newly emerged *M. sexta* larvae were starved for 2 h and then fed with a single drop of 1 μ l containing 4 μ g dsRNA (4 μ g of dsRNA/larva). Each larva was located in front of the drop, and we took care to observe that each of them ingested the complete drop. Larvae that did not consume the drop were not further analyzed. Additional larvae were fed with water without dsRNA and used as control group. After feeding, larvae were reared on a diet without toxin under standard rearing conditions for 12 h. We used a total of 72 larvae in each treatment, and three repetitions were performed.

Larvae from the control and dsRNA feed treatments were randomly divided into two groups. One group was placed on an untreated control diet, and the other group was placed on a diet containing 25 ng/cm² of Cry1Aa, Cry1Ab, or Cry1Ac purified crystals. Individual larvae were placed into separate wells of a 24-well plate, and larval mortality was evaluated after 7 days.

Quantitative real-time PCR. Seven days postfeeding, larvae that were not exposed to toxin were evaluated for expression of *apn1* and *alp*. Ten larval guts from each of the control or dsRNA feed groups were dissected into RNAlater, and total RNA was isolated (RNeasy kit; Qiagen). Quantitative real-time PCR was performed on each template using primers listed in Table 1 on a LightCycler 480 instrument (Roche) using a Sybr green I detection system (Fermentas Life Sciences). Relative-fold calculations were made with duplicates for each treatment group, analyzing the *rps3* (ribosomal protein S3) gene to normalize gene expression.

RESULTS

Binding of Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac toxins to *M. sexta* BBMV proteins. We determined the LC₅₀s for Cry1Aa, Cry1Ab,

and Cry1Ac toxins and found that the three toxins have similar toxicities to first-instar *M. sexta* larvae, although Cry1Aa showed a slightly lower toxicity, with an LC₅₀ of 3 ng/cm² (fiducial limits, 0.4 to 5), than Cry1Ab and Cry1Ac, which showed LC₅₀s of 1 ng/cm² (fiducial limits, 0.4 to 1.8) and 0.7 ng/cm² (fiducial limits, 0.1 to 1.1), respectively.

To determine the binding of the three Cry1A toxins to *M. sexta* BBMV proteins, ligand blot analysis of biotinylated Cry1A toxins was performed using BBMV samples obtained from first-, third-, and fifth-instar *M. sexta* larvae. When analyzing the binding to BBMV from the first and third instars, Cry1Aa and Cry1Ab were found to have similar binding properties (Fig. 1); both toxins bound to several proteins, where one of them could correspond to ALP protein of 65 kDa. The binding of these two toxins to BBMV prepared from fifth-instar larvae showed that both proteins bound to a 120-kDa protein that could correspond to APN1, and Cry1Ab also bound to a 210-kDa protein that could correspond to cadherin protein. In contrast, Cry1Ac toxin interacted only with APN1 in the three larval instars that were analyzed. The identity of the 65-, 120-, and 210-kDa proteins as ALP, APN1, and cadherin, respectively, was confirmed by Western blotting assays using specific polyclonal antibodies (see Fig. S1 in the supplemental material), suggesting that cadherin and APN1 expression is increased during larval development, while ALP is produced through larval development, with a higher expression during the third instar and a slightly lower expression in the last larval instar (see Fig. S1).

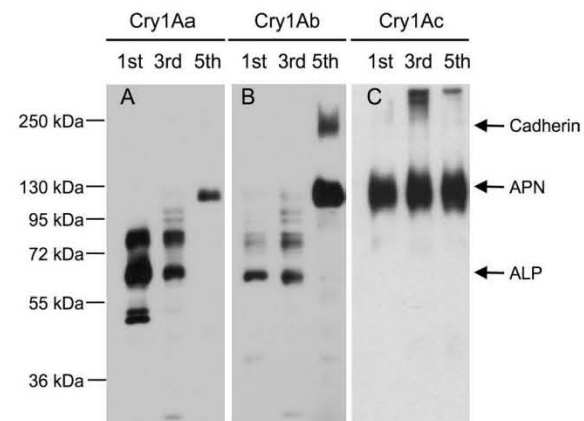


FIG 1 Differential binding of Cry1A toxins to *Manduca sexta* BBMV proteins during larval development. Cry1A-binding proteins were revealed by ligand blot analysis of biotinylated Cry1Aa (A), Cry1Ab (B), and Cry1Ac (C) toxins using BBMV prepared from *M. sexta* larvae from the first, third, and fifth instars, respectively.

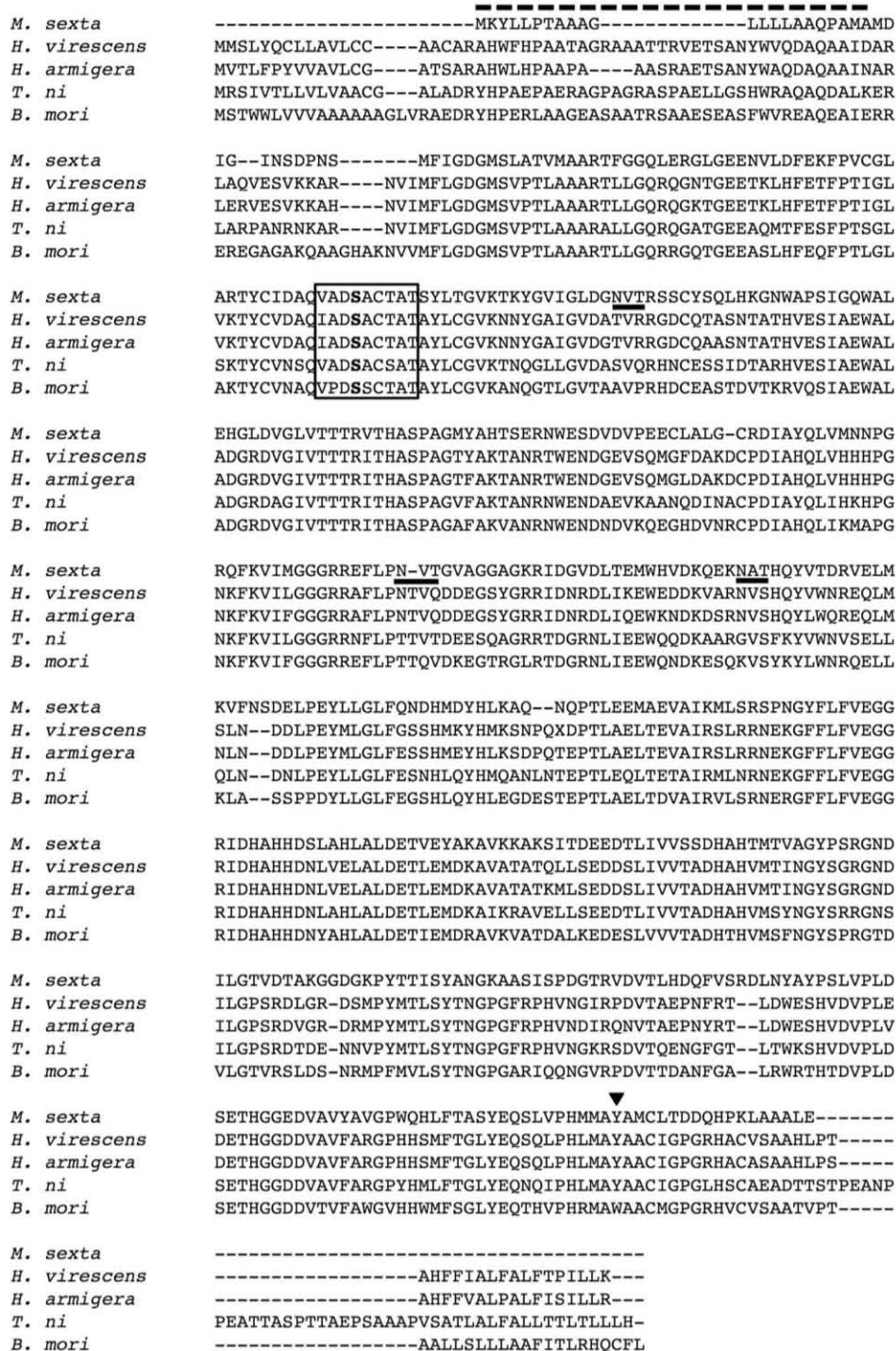


FIG 2 Protein sequence of MsALP from the midguts of *M. sexta* larvae. Multiple-sequence alignment of the deduced Ms-ALP amino acid sequence against ALPs from other lepidopteran insects was conducted using ClustalX. A dashed line indicates the amino-terminal signal peptide. The predicted phosphate domain is included in a box, with the predicted active site in bold. Putative N-glycosylation sites are underlined. A predicted GPI anchor site is indicated with a triangle.

Binding of Cry1A toxins to recombinant expressed MsALP.

Previously, it was shown by surface plasmon resonance (SPR) binding analysis that Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac bound to purified *M. sexta* APN1 protein with similar *K_d*s (apparent affinities) ranging from 28 to 40 nM (29). To determine the rates of binding of the three Cry1A toxins to ALP receptor, we cloned a full-length ALP cDNA from RNA samples obtained from second-instar larvae where we observed binding of Cry1Ab to ALP (7). The full-length ALP clone (MsALP) revealed an open reading frame of 1,473 residues with a predicted molecular mass of 53.4 kDa and an isoelectric point of 5.08. The MsALP shared amino acid sequence identity with different insect ALPs, such as those of *Bombyx mori* (56%, GenBank accession no. AB013386.1), *Heliothis virescens* (54%, GenBank accession no. FJ416470.1), *Helicoverpa armigera* (53%, GenBank accession no. ACF40807.1), and *Trichoplusia ni* (53%, GenBank accession no. AEG79734.1) (Fig. 2). The full-length MsALP was cloned into the *E. coli* expression vector and purified from inclusion bodies.

The affinities of binding of Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac to MsALP were determined in real time by SPR analyses (Fig. 3). The overall affinities of Cry1Aa and Cry1Ab for binding to MsALP (*K_d*) were 268 nM and 289 nM, respectively, estimated from the association rate constant (*k_{on}*) and dissociation rate constant (*k_{off}*) values (Fig. 3A and B). In contrast, Cry1Ac bound immobilized MsALP with the low apparent binding affinity of 4 μ M (Fig. 3C). These results show that Cry1Aa and Cry1Ab bound MsALP with a 16-fold-higher affinity than that of Cry1Ac.

Toxicities of Cry1A toxins to *M. sexta* ALP- or APN1-silenced larvae. To determine the role of MsALP and APN1 in the toxicity of the three Cry1A toxins to *M. sexta* larvae, we determine the toxicity of the three toxins to MsALP- or APN1-silenced larvae. The dsRNAs of 308 bp from the MsAPN1 gene and 434 bp from the ALP gene were produced by *in vitro* transcription using T7 polymerase. *M. sexta* neonate larvae were starved for 2 h and then fed with 4 μ g of dsRNA in a droplet, leaving the treated larvae on a normal diet until they reach the second instar. RNA and protein were extracted from the treated larvae to analyze MsALP and APN1 transcript and protein levels. qRT-PCR analyses showed reductions of MsALP and APN1 transcripts of 80% and 84%, respectively (Fig. 4A). Accordingly, a significant reduction of MsALP and APN1 proteins was observed by Western blotting of midgut tissues from individual silenced larvae (Fig. 4B and C). It is important to mention that silencing the expression of specific proteins by feeding the larvae with dsRNA was not 100% efficient, and some larvae showed expression of APN1 or ALP. In general, protein silencing by dsRNA was observed in 70 to 90% of the analyzed larvae. In addition, Fig. 4A shows that MsALP-silenced larvae were not affected in APN1 gene expression and that APN1-silenced larvae were not affected in MsALP expression. To determine the effect of MsALP and APN1 gene silencing on the toxicity of Cry1A toxins, larvae treated with *alp* dsRNA or with *apn* dsRNA as described above were fed a diet containing 25 ng/cm² of each toxin, and mortality was recorded after 7 days of exposure to these toxins. As controls, we fed larvae with two unrelated dsRNAs from LacZ (30) and MalE (New England BioLabs). The larvae that survived in the bioassay with the different Cry1A toxins were analyzed by Western blotting, showing that in all cases the expression of toxin receptors of either APN or ALP was reduced (see Fig. S2 in the supplemental material). Figure 5 shows the mortality levels of the APN- or ALP-silenced *M. sexta* larvae compared to control

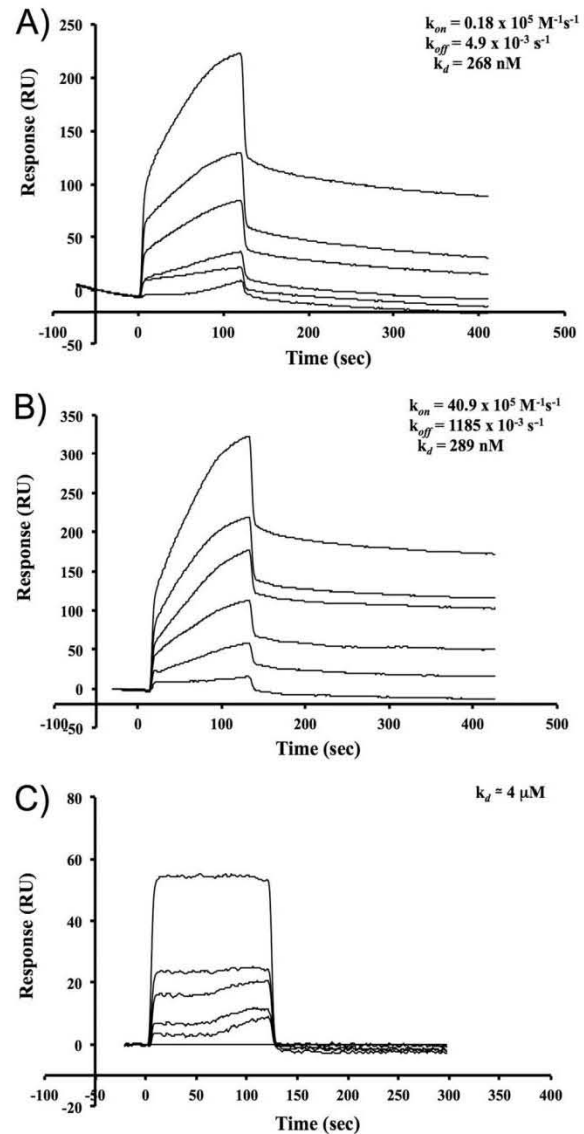


FIG 3 Cry1Ac binds to MsALP with lower affinity than Cry1Aa and Cry1Ab toxins. SPR analysis of binding of Cry1Aa (A), Cry1Ab (B), and Cry1Ac (C) to immobilized MsALP was conducted by conventional amine coupling. Sensorgrams of serial dilutions of Cry1A toxins from 1 to 100 nM are shown. For the kinetics of binding of Cry1Aa and Cry1Ab toxins to *M. sexta* alkaline phosphatase, *k_{on}* is the association rate constant, *k_{off}* is the dissociation rate constant, and *K_d* is the apparent affinity (*k_{off}*/*k_{on}*).

larvae. It was observed that APN1- or MsALP-silenced larvae showed similarly reduced mortality due to Cry1Aa toxin, 50% or 60%, respectively, compared to control larvae, in which 100% mortality was observed. For Cry1Ab toxin, a higher reduction of mortality was observed in MsALP-silenced larvae, 80% reduction, compared to APN1-silenced larvae, in which a 40% reduction in mortality was observed compared to that of control larvae. Finally, for Cry1Ac toxin, the most significant reduction in mortality was observed with APN1 silencing (70%), in contrast to MsALP si-

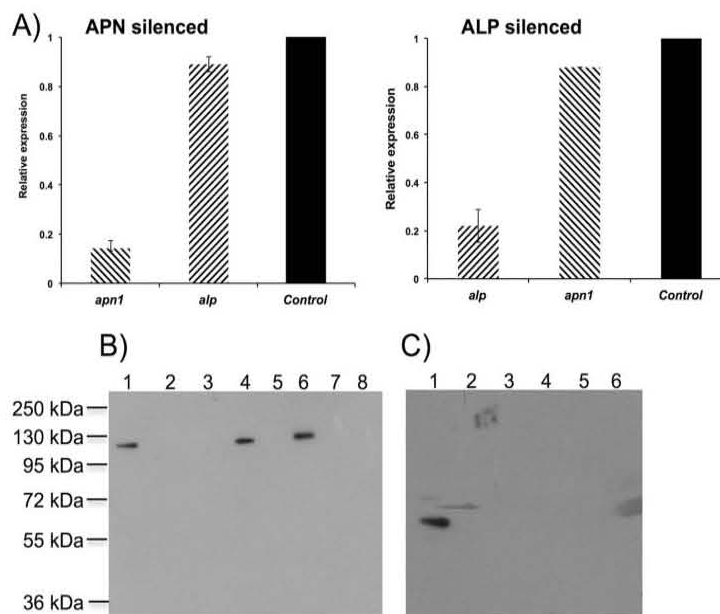


FIG 4 Efficient silencing of MsALP and APN1 by feeding specific dsRNA to neonate *M. sexta* larvae. (A) Transcript abundance was determined using qRT-PCR and Sybr green. Bars represent the means and standard errors for 5 individual midguts. (B) APN Western blot of midgut proteins (5 μ g) prepared from individual control larvae (lane 1) and 5 *apn* dsRNA-fed larvae (lanes 2 to 8). (C) ALP Western blot of midgut proteins (5 μ g) prepared from individual control larvae (lane 1) and 5 *alp* dsRNA-fed larvae (lanes 2 to 6).

lencing, with which a reduction of only 20% in mortality was observed. These data show that Cry1Aa relies similarly on both receptor molecules, while Cry1Ab relies the most on MsALP and Cry1Ac on APN1 for toxicity.

DISCUSSION

In the mode of action of Cry1A toxins, it has been suggested that ALP and APN could have redundant roles on Cry1A toxicity, in which these insect molecules have been proposed to fulfill two roles: first, as abundant low-affinity binding sites for monomeric Cry1A toxins that have a role in carrying the toxin to the insect epithelium, where the toxins bind to cadherin receptor, and second, as a high-affinity binding site for Cry1A oligomers, facilitating oligomer insertion into the membrane. However, previous work suggested that Cry1Ac preferentially binds APN1, whereas Cry1Ab preferentially interacts with ALP (7, 8, 31). As mentioned previously, Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac differ in domain II and domain III, which are involved in receptor interaction. These findings could suggest that both GPI-anchored proteins may play a differential role in the toxicity of the three Cry1A toxins produced by *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

The analysis of the binding of Cry1A toxins to BBMV proteins, along with the analysis of the expression of APN1, ALP, and cadherin during larval development, suggested that Cry1Aa and Cry1Ab interact principally with ALP during the first larval instar, while Cry1Ac interacts principally with APN1 through all larval development, suggesting that Cry1Ac relies principally on APN interaction, in contrast to Cry1Aa and Cry1Ab. The observation that Cry1Aa and Cry1Ab proteins bound to ALP only in early instars despite the fact that ALP was observed in all instars by Western blotting suggests that a second ALP isoform that does not

bind Cry1A toxins is produced during late-instar stages of development.

Here we show that Cry1Aa and Cry1Ab bound recombinant MsALP with similar binding affinities, in contrast to Cry1Ac, which bound MsALP with a 16-fold-lower binding affinity. Nevertheless, it has been shown that Cry1Ac relies on *N*-acetylgalactosamine interaction for binding to APN1 (16), and recombinant MsALP produced in *E. coli* is not glycosylated, explaining the low affinity of binding of Cry1Ac to this MsALP. In *Heliothis virescens*, Cry1Ac binding to ALP also relies on sugar interaction (32).

Finally, we evaluated the *in vivo* role of *M. sexta* APN1 and ALP in the toxicity of the three Cry1A toxins by gene silencing with specific dsRNA molecules. We observed a differential effect of APN1 or ALP downregulation in the toxicity of the three Cry1A toxins. The toxicity data shown in Fig. 5 indicate that Cry1Aa relies similarly on both APN1 and ALP, indicating a redundant role of these molecules in Cry1Aa toxicity. However, toxicity data for ALP-silenced larvae clearly indicate that Cry1Ab principally interacts with ALP to exert its toxic effect, while Cry1Ac relies principally on APN1. In the case of Cry1Ab, we showed previously that a single mutation in domain III residue L511 reduced binding to ALP, in contrast to APN, and affected the toxicity, indicating that domain III is important for ALP interaction and that Cry1Ab relies primarily on interaction with ALP rather than on APN binding (7). Cry1Aa and Cry1Ab have similar domain III sequences, explaining the important role of MsALP in the toxicity of both toxins. In the case of Cry1Ac, the domain III *N*-acetylgalactosamine binding pocket is an important binding epitope for APN1 interaction, explaining the differential binding of the three toxins to both receptor molecules (29). Overall, the results presented here indicate that Cry1A toxins differentially interact with

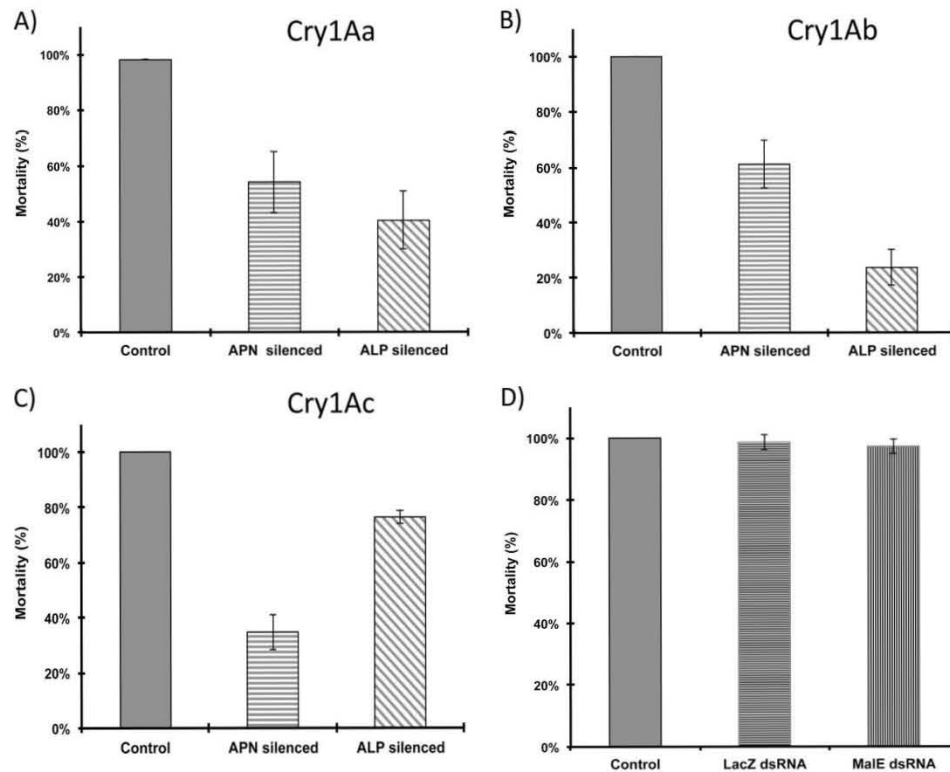


FIG 5 Effects of MsALP and APN1 gene silencing on the toxicity of Cry1A toxins. *M. sexta* MsALP-silenced, APN-silenced, or control larvae were exposed to a diet containing 25 ng/cm² of Cry1Aa (A), Cry1Ab (B), or Cry1Ac (C), and mortality was recorded after 7 days. Seventy-two larvae were used in each treatment. (D) Mortality of larvae that were fed with nonrelated dsRNA sequences (LacZ and MalE) after treatment with Cry1Ab toxin. Bars represent the means and standard errors.

the two GPI-anchored receptors to exert their toxicity and show that ALP and APN1 have a differential role in the mode of action of each one of the *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* Cry1A toxins.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported in part by a grant from DGAPA/UNAM IN209011 and CONACyT 83135. I.G. is especially thankful for a L'Oreal-UNESCO-AMC fellowship supporting this work.

We thank Jorge Sánchez for providing excellent technical assistance and Lizbeth Cabrera for insect maintenance.

REFERENCES

- Bravo A, Likitvatanavong S, Gill SS, Soberon M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41:423–431.
- Tabashnik BE, Van Rensburg JB, Carriere Y. 2009. Field-evolved insect resistance to *Bt* crops: definition, theory, and data. *J. Econ. Entomol.* 102: 2011–2025.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775–806.
- Soberón M, Pardo L, Muñoz-Garay C, Sanchez J, Gomez I, Porta H, Bravo A. 2010. Pore formation by Cry toxins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 677: 127–142.
- Gómez I, Sanchez J, Miranda R, Bravo A, Soberon M. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* 513:242–246.
- Pigott CR, Ellar DJ. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71:255–281.
- Arenas I, Bravo A, Soberon M, Gomez I. 2010. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *J. Biol. Chem.* 285:12497–12503.
- Pacheco S, Gomez I, Arenas I, Saab-Rincon G, Rodriguez-Almazan C, Gill SS, Bravo A, Soberon M. 2009. Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a “ping pong” binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. *J. Biol. Chem.* 284:32750–32757.
- 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.
- Zhang X, Candas M, Griko NB, Taussig R, and Bulla LA, Jr. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:9897–9902.
- Nagamatsu Y, Koike T, Sasaki K, Yoshimoto A, Furukawa Y. 1999. The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Aa toxin. *FEBS Lett.* 460:385–390.
- Fabrick J, Oppert C, Lorenzen MD, Morris K, Oppert B, Jurat-Fuentes JL. 2009. A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. *J. Biol. Chem.* 284: 18401–18410.
- Soberón M, Pardo-Lopez L, Lopez I, Gomez I, Tabashnik BE, Bravo A. 2007. Engineering modified *Bt* toxins to counter insect resistance. *Science* 318:1640–1642.
- Gill M, Ellar D. 2002. Transgenic *Drosophila* reveals a functional *in vivo*

- receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. *Insect Mol. Biol.* 11:619–625.
15. 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.
 16. Burton SL, Ellar DJ, Li J, Derbyshire DJ. 1999. N-Acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J. Mol. Biol.* 287:1011–1022.
 17. You TH, Lee MK, Jenkins JL, Alzate O, Dean DH. 2008. Blocking binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa to *Bombyx mori* cadherin receptor results in only a minor reduction of toxicity. *BMC Biochem.* 9:3. doi:10.1186/1471-2091-9-3.
 18. Jurat-Fuentes JL, Karumbaiah L, Jakka SR, Ning C, Liu C, Wu K, Jackson J, Gould F, Blanco C, Portilla M, Perera O, Adang M. 2011. Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS One* 6:e17606. doi:10.1371/journal.pone.0017606.
 19. Hofte H, Whiteley HR. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242–255.
 20. de Maagd RA, Bakker PL, Masson L, Adang MJ, Sangadala S, Stiekema W, Bosch D. 1999. Domain III of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac is involved in binding to *Manduca sexta* brush border membranes and to its purified aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 31:463–471.
 21. Lereclus D, Arantes O, Chaufaux J, Lecadet M. 1989. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 51:211–217.
 22. Arantes O, Lereclus D. 1991. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* 108:115–119.
 23. Lereclus D, Agaisse H, Gominet M, Chaufaux J. 1995. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* spo0A mutant. *Biotechnology* 13:67–71.
 24. Thomas WE, Ellar DJ. 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.
 25. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
 26. Wolfersberger MG. 1993. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the gypsy moth (*Lymantria dispar*). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 24:139–147.
 27. Pauchet Y, Wilkinson P, Vogel H, Nelson DR, Reynolds SE, Heckel DG, Ffrench-Constant RH. 2010. Pyrosequencing the *Manduca sexta* larval midgut transcriptome: messages for digestion, detoxification and defence. *Insect Mol. Biol.* 19:61–75.
 28. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
 29. Masson L, Lu YJ, Mazza A, Brousseau R, Adang MJ. 1995. The Cry1A(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. *J. Biol. Chem.* 270:20309–20315.
 30. Jiménez AI, Reyes EZ, Cancino-Rodezno A, Bedoya-Perez LP, Cabalero-Flores GG, Muriel-Millan LF, Likitvivanavong S, Gill SS, Bravo A, Soberon M. 2012. *Aedes aegypti* alkaline phosphatase ALP1 is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42:683–689.
 31. Chen J, Brown MR, Hua G, Adang MJ. 2005. Comparison of the localization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A delta-endotoxins and their binding proteins in larval midgut of tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res.* 321:123–129.
 32. Perera OP, Willis JD, Adang MJ, Jurat-Fuentes JL. 2009. Cloning and characterization of the Cry1Ac-binding alkaline phosphatase (HvALP) from *Heliothis virescens*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39:294–302.

Figure S1

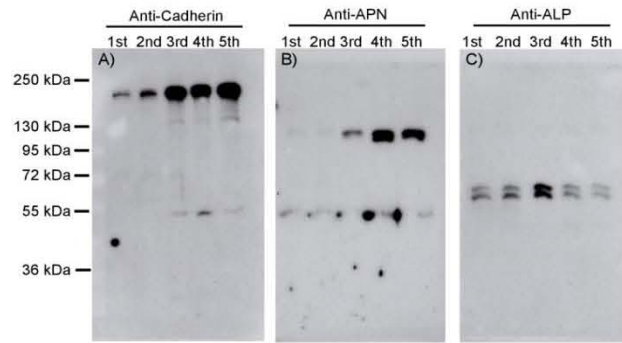


Figure S1. Expression of different Cry1A receptors during larval development of *Manduca sexta*. Immunodetection of cadherin (A) APN (B) or ALP (C) during larval development analyzed by Western blot.

Figure S2

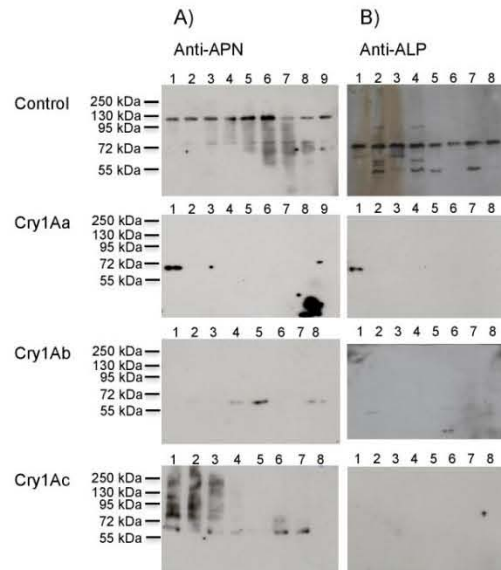


Figure S2. Expression of APN and MsALP in *apn*- and *alp*-silenced larvae that survive after toxin ingestion. Silenced MsALP or APN1 larvae that survived to Cry1A toxin intoxication for seven days do not produce MsALP or APN1 respectively as revealed by Western blot analysis. (A) Detection of APN in control larvae fed with water or in *apn*-silenced larvae that survived after intoxication with Cry1Aa, Cry1Ab or Cry1Ac and (B) Detection of ALP in *alp*-silenced larvae that survived to exposure to the different Cry1A toxins and in the control larva fed with water. Individual midguts were recovered and analyzed by Western blot.

Anexo 2. Colaboración de la estudiante en otro proyecto.

Role of UPR Pathway in Defense Response of *Aedes aegypti* against Cry11Aa Toxin from
Bacillus thuringiensis

Bedoya-Pérez L. P., Cancino-Rodezno A., **Flores-Escobar B.**, Soberón M., Bravo A. 2013
Int. J. Mol. Sci. 14: 8467-8478

Article

Role of UPR Pathway in Defense Response of *Aedes aegypti* against Cry11Aa Toxin from *Bacillus thuringiensis*

Leidy P. Bedoya-Pérez, Angeles Cancino-Rodezno, Biviana Flores-Escobar, Mario Soberón and Alejandra Bravo *

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. AP 510-3, Cuernavaca 62250, Morelos, Mexico; E-Mails: lbedoya@ibt.unam.mx (L.P.B.-P.); angelescancino@gmail.com (A.C.-R.); biviana@ibt.unam.mx (B.F.-E.); mario@ibt.unam.mx (M.S.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: bravo@ibt.unam.mx; Tel.: +52-777-329-1635; Fax: +52-777-329-1624.

Received: 29 January 2013; in revised form: 14 March 2013 / Accepted: 18 March 2013 /

Published: 17 April 2013

Abstract: The insecticidal Cry toxins are pore-forming toxins produced by the bacteria *Bacillus thuringiensis* that disrupt insect-midgut cells. Cells can trigger different survival mechanisms to counteract the effects of sub-lytic doses of pore forming toxins. Particularly, two signaling pathways have been demonstrated to play a role in the defense mechanism to other toxins in *Caenorhabditis elegans* and in mammalian cells. These are the unfolded protein response (UPR) and the sterol regulatory element binding proteins (SREBP) pathways, which are proposed to facilitate membrane repair responses. In this work we analyzed the role of these pathways in *Aedes aegypti* response to intoxication with Cry11Aa toxin. We show that UPR is activated upon toxin ingestion. The role of these two pathways was analyzed *in vivo* by using RNA interference. We silenced the expression of specific proteins in *A. aegypti* larvae. Gene silencing of Ire-1 and Xbp-1 proteins from UPR system, resulted in hypersensitive to Cry11Aa toxin action. In contrast, silencing of Cas-1, Scap and S2P from SREBP pathway had no affect on Cry11Aa toxicity in *A. aegypti* larvae. However, the role of SREBP pathway requires further studies to be conclusive. Our data indicate that the UPR pathway is involved in the insect defense against Cry toxins.

Keywords: Cry toxins; *Bacillus thuringiensis*; UPR; SREBP; defense responses

1. Introduction

The three-domain Cry (3d-Cry) toxins produced by *Bacillus thuringiensis* bacteria are insect pathogenic proteins. The 3d-Cry toxins are pore-forming toxins that affect the midgut cells of their insect hosts [1]. They are specific since they interact with specific proteins located in apical membrane of insect midgut cells. The sequential interaction with these toxin receptors facilitates the oligomerization of the toxin and its insertion into the membrane, forming a pore that kills the cells and the larvae. 3d-Cry toxins are currently used as an efficient control practice of insect-pests worldwide and have helped to reduce the use of chemical insecticides [2].

The 3d-Cry toxins show toxicity to different insect species belonging to several insect orders such as Coleoptera, Lepidoptera and Diptera, which are important pests in agriculture or in public health, since they attack main agricultural crops or are vectors of important human-diseases such as dengue and malaria [1].

In this work we studied the host responses to toxin action, specifically the responses of the mosquito *Aedes aegypti* upon intoxication with Cry11Aa toxin from *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Several studies have reported that cells trigger different survival mechanisms to counteract the effects of sub-lytic doses of pore forming toxins. These host responses may include adaptive or innate immunity responses as well as cellular non-immune defenses [3]. Cells are able to sense the changes in ion concentrations and repair the damage in their plasma membrane. Different responses have been documented in insects [4], nematodes [5,6] and mammalian cells [7–9]. Among these responses the activation of signaling pathways such as mitogen activated kinases p38 and JNK, caspase-1 that induces activation of the inflammasome and sterol regulatory element binding proteins (SREBP), autophagy and unfolded protein responses (UPR) have been shown to participate in overcoming toxin effects and promoting cell survival [4–10].

We have previously shown that MAPK p38 participates in the defense to Cry1Ab toxin in the Lepidoptera *Manduca sexta* and to Cry11Aa toxin in the Diptera *A. aegypti* [4]. We became interested in the study of the UPR and SREBP responses, since both have been proposed to challenge toxin action by facilitating membrane repair in *Caenorhabditis elegans* and in mammalian cells, when they were exposed to Cry5Ba toxin or to aerolysin respectively [5,7]. We determined if similar mechanisms exist in insects to protect them from the action of 3d-Cry toxins.

The UPR system responds to unfolded proteins in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) by activating at least three different signal transduction pathways that are mediated by ATF-6, PERK and IRE-1 [11]. It was shown that in particular the IRE-1 arm of UPR system is activated upon intoxication with pore forming toxins in the nematode and in mammalian cells and this response was directly related to survival [5].

Proteins of the SREBPs pathway are membrane bound transcription factors that initially reside in ER and form a complex with SCAP protein. The SREBP-SCAP complex is transported to Golgi apparatus where they are cleaved by specific proteases, named S1P and S2P, to release the transcription factor domain [12]. The SREBP system is activated after infection of mammalian cells with aerolysin promoting cell survival most probably by the upregulation of lipogenic genes involved in membrane repair [7,9].

In this work we used dsRNA interference system to silence expression of specific proteins of these two signaling pathways in *A. aegypti* larvae in order to analyze if they play a role *in vivo* against the action of Cry11Aa toxin.

2. Results

2.1. Role of IRE-1 UPR Pathway in Response to Cry11Aa in *A. aegypti*

IRE-1 (inositol requiring enzyme 1) is part of the UPR system response to stress situations, that was directly associated with stress induced by pore forming toxins [3,5]. IRE-1 is a highly conserved protein with a dual function as kinase/endonuclease that cleaves out an intron of 23 nucleotides in the mRNA of the transcription factor XBP-1 (X-box binding protein 1) [11]. We analyzed the sequence of *xbp-1* gene of *C. elegans* and *A. aegypti* and found out that the 23 bp sequence of the intron that is cleaved out during RNA-splicing is highly conserved, showing 60% identity (Figure 1A). In order to analyze if intoxication with Cry11Aa could activate IRE-1, we analyzed the splicing event of *xbp-1* mRNA by RT-PCR. Twenty fourth-instar larvae were fed with Cry11Aa for 2 h using a concentration of toxin that kills 50% of the population in 24 h and compared with control larvae without toxin. As a positive control we used tunicamycin that is a natural compound that leads to accumulation of unfolded proteins and functions as an activator of IRE-1 [13]. Figure 1B shows that treatment of *A. aegypti* larvae with Cry11Aa induced the splicing of *xbp-1* mRNA similar to the treatment with tunicamycin, indicating that Cry11Aa intoxication activates the IRE-1 branch of UPR.

To determine if UPR pathway plays a role in the defense of *A. aegypti* against Cry11Aa toxin *in vivo*, we silenced the expression of IRE-1 and XBP-1 proteins by using RNAi. We cloned two fragments of *ire-1* and *xbp-1* genes in pLITMUS and produced specific dsRNA of these genes. The silencing of *ire-1* resulted in a lower transcription levels of *ire-1* (35% lower expression), as shown in the RT-PCR analysis (Figure 2A). RNA transcript levels were also determined by real-time quantitative PCR (qPCR) as described in Experimental section showing an 82% reduction of *ire-1* transcripts (Figure 2C). The low expression of *ire-1* resulted in a hypersensitive phenotype to Cry11Aa intoxication since larvae became more sensitive to Cry11Aa toxin showing an LC₅₀ value that was 2.6 times lower than that of control larvae (Table 1). We observed 80% surviving of silenced larvae up to the 4th instar and 95% surviving in the control larvae that were fed only with Effectene-vesicles without dsRNA. Nevertheless, it is important to mention that the *ire-1* silenced larvae grew similar to the control larvae and they looked healthy under control conditions without toxin intoxication.

Figure 1. The splicing of *xbp-1* by the IRE-1 kinase/endonuclease is induced as response to Cry11Aa intoxication in *Aedes aegypti*. **(A)** Alignment of the sequence of the 23 nucleotides that constitutes the intron of *xbp-1* that is cleaved in *C. elegans* and the corresponding sequence in *A. aegypti*; **(B)** Splicing of *xbp-1* is induced in *A. aegypti* by tunicamycin or after 2 h of intoxication with Cry11Aa toxin at LC₅₀. M, nucleotide size markers. Control, were larvae feed without toxin.

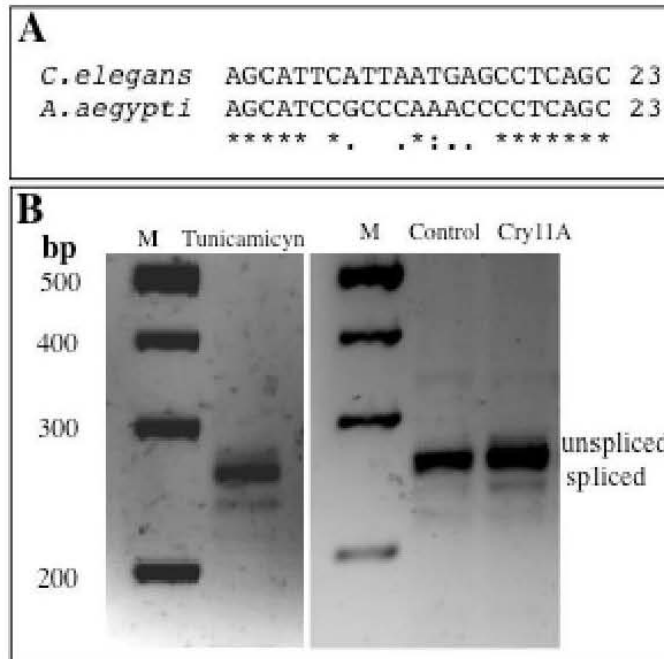


Figure 2. Silencing of IRE-1 branch of UPR pathway by RNAi in *Aedes aegypti* larvae. **(A)** The expression of *ire-1* gene was analyzed by RT-PCR assays in larvae that were feed with *ire-1*-dsRNA and in control larvae; **(B)** The expression of *xbp-1* gene was analyzed by RT-PCR assays in larvae that were feed with *xbp-1*-dsRNA and in control larvae. Numbers under the bands are percentage in relation to the control band, after densitometry analysis. The control bands correspond to non-silenced larvae and were considered as 100%. The expressions of tubulin or rpS3 were used to normalize the results; **(C)** Transcript abundance was determined using qRT-PCR and SYBER green. Bars represent the means and standard errors of three repetitions.

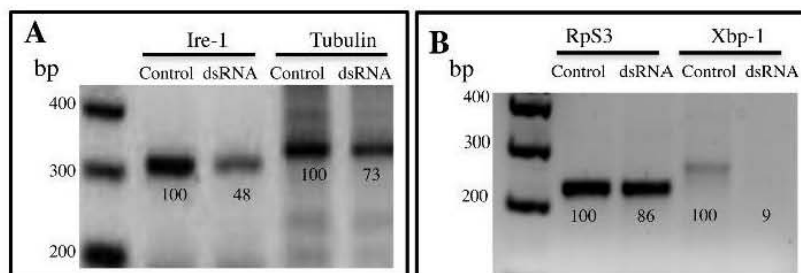


Figure 2. Cont.

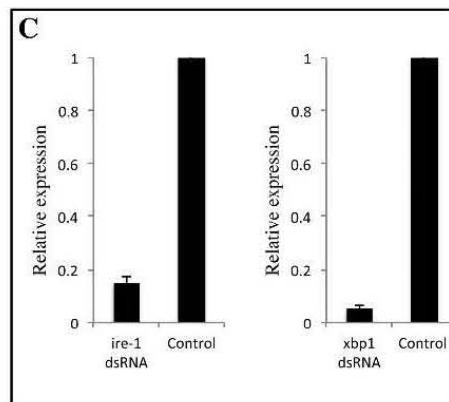


Table 1. Percentage of larval survival up to 4th instar after silencing and toxicity of spore-crystal suspensions of Cry11Aa against *Aedes aegypti* larvae.

Silenced protein	Larval survival % ^b	LC ₅₀ value (95% fiducial limits)	Fold increase in susceptibility
Control	95	555 (408–725)	-
IRE-1	80	214 (137–306)	2.6
XBP-1	83	176.4 (127.1–222.6)	3.1
CASP1(Q16MZ1)	98	392.7 (230.6–542.4)	NS ^a
SCAP	62	683 (475–1160)	NS
S2P	87	355 (137–533)	NS

^a NS, non-significant changes with the control larvae as estimated by Probit analysis of confidence intervals since the fiducial limits are overlapping; ^b Differences in percentage of survival were 1%–5%.

In order to confirm the participation of UPR pathway in defense mechanism against Cry11Aa intoxication in the mosquito, the effect of silencing of XBP-1 protein in the susceptibility of *A. aegypti* to Cry11Aa toxin was also analyzed. The silencing of the expression of this protein was quite effective since we observed a reduction of 93% in the levels of *xbp-1*-mRNA (Figure 2B). RNA transcript levels determined by qPCR confirmed a reduction of *xbp-1* transcripts of 95% (Figure 2C). We found that silencing this protein did not affect severely the larvae development since 83% of the silenced larvae survived up to the 4th instar and look healthy without toxin administration. The only difference in this case, was that the larvae grew more slowly than the control and required 3–5 more days to reach the 4th instar. The bioassays performed with the *xbp-1* silenced larvae showed 3.1 fold higher sensibility to the toxin, confirming the participation of UPR pathway in defense against Cry11Aa intoxication (Table 1).

2.2. Role of SREBP Pathway in Response to Cry11Aa in *A. aegypti*

It was reported that in mammals, caspase 1 is involved in activation of SREBP pathway after intoxication with the pore forming toxin aerolysin [7]. Specifically in the case of *D. melanogaster* it was shown that caspase-Drice is directly involved in the activation of SREBP [14]. We performed a sequence alignment and phylogenetic analysis of caspase-1 sequences from insects, including the

sequence of caspase-1 from humans. We found out that caspase-1 (Q16MZ1) from *A. aegypti* has 74% identity with caspase-Drice from *D. melanogaster* and 79% identity with Caspase-1 from *Anopheles gambiae* (Figure 3 and Table 2). We also found the orthologous proteins of S2P and SCAP which showed specially high identity with S2P and SCAP proteins from *Culex quinquefasciatus* (Table 2) and decided to analyze the effect of silencing these proteins in *A. aegypti* regarding to larval sensibility to Cry11Aa toxin.

Figure 3. Phylogenetic tree of Cas-1 proteins from different insects and from humans.

A phylogenetic tree was constructed using the following sequences: Cas-1 from *Bombyx mori* (Q8I9V7), *Spodoptera frugiperda* (P89116), *Trichoplusia ni* (B6EEC1) *Helicoverpa armigera* (A7L9Z3), *Drosophila melanogaster* (O01382), *D. melanogaster* (Q9XYF4), *Culex quinquefasciatus* (B0W0K2), *Musca domestica* (B5AK94), *Aedes aegypti* (Q16MZ1), *A. aegypti* (Q16FR8), *Homo sapiens* (P29466) and Cas-3 from *A. aegypti* (Q178B6) and *C. quinquefasciatus* (B0WZJ4).

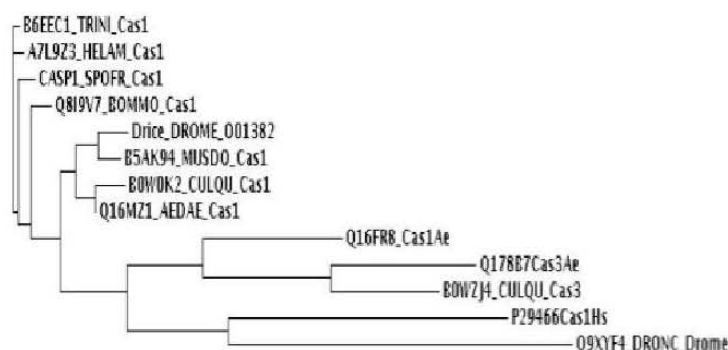
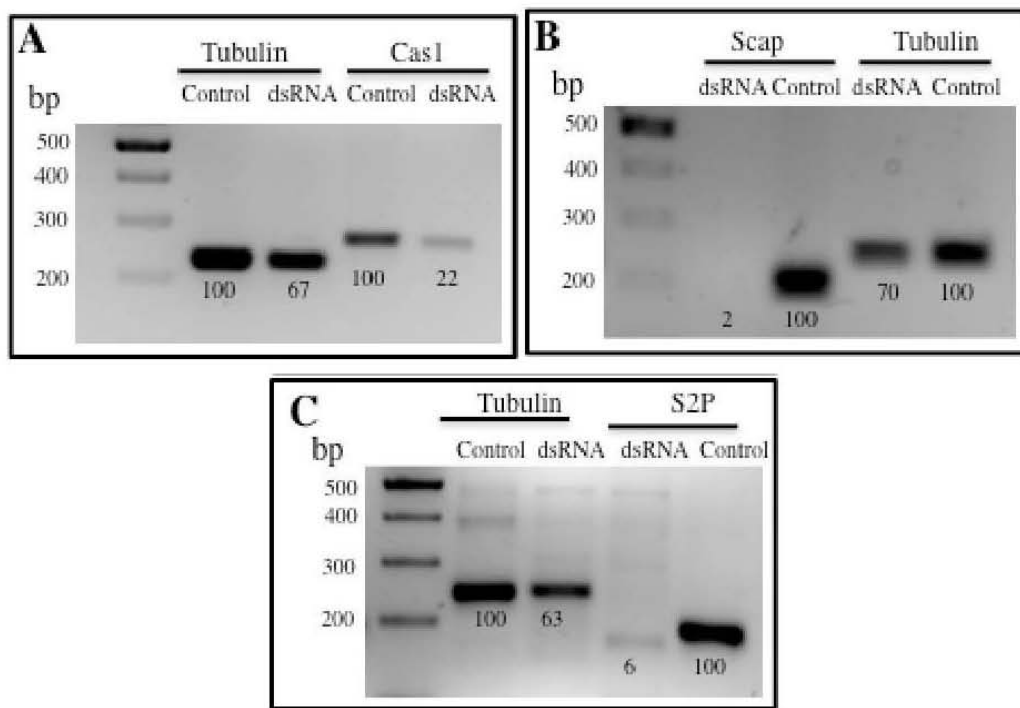


Table 2. Percentage of identity with similar proteins described in other insects.

Protein (Accession number)	Percentage of identity (Accession number)		
<i>Aedes aegypti</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
Ire-1 (XM_001655187.1)	77% (XP_001843113)	61% (XP_562694)	55% (NP_001097839)
Xbp-1 (XM_001651044.1)	66% (XP-001847153)	61% (XP-310116)	46% (NP-524722)
Cas-1 (XM_001655826.1)	94% (XP-001842236)	79% (XP-316795)	74% (CAA72937)
Scap (XM_001651241.1)	89% (XP_001863686)	74% (XP_309314)	54% (AAM20923)
S2P (XM_001663618.1)	84% (XP_001663668)	68% (XP_320696)	46% (NP_610705)

The silencing of Caspase-1 in *A. aegypti* resulted in 64% reduction of the expression of its mRNA (Figure 4A). This silencing did not affect the viability of the larvae since they could survive up to the 4th instar similar to the control larvae. The susceptibility to Cry11Aa toxin increased 1.4 fold, but this change was not significant since confidential limits overlap (Table 1). On the other side, silencing of SCAP and S2P was effective showing 91% and 97% reduction in their corresponding mRNA levels (Figure 4B,C). Silencing of these genes did not affect the susceptibility to Cry11Aa toxin in *A. aegypti* since LC_{50} values observed showed a clear overlap in the confidence interval values, suggesting that differences in LC_{50} values were not significant (Table 1). However, it is interesting to note that the absence of SCAP we observed reduced viability of the larvae to 62% suggesting that SREBP pathway is important in maintaining the homeostasis of the lipid content in the membrane.

Figure 4. Silencing of SREBP pathway by RNAi in *Aedes aegypti* larvae. (A) The expression of *cas-1* gene was analyzed by RT-PCR assays in larvae that were feed with *cas1*-dsRNA and in control larvae; (B) The expression of *scap* gene was analyzed by RT-PCR assays in larvae that were feed with *scap*-dsRNA and in control larvae; (C) The expression of *s2p* gene was analyzed by RT-PCR assays in larvae that were feed with *s2p*-dsRNA and in control larvae. Numbers under the bands are percentage in relation to the control band, after densitometry analysis. The control bands correspond to non-silenced larvae and were considered as 100%. Expression of tubulin was used to normalize the results.



3. Discussion

The UPR system is a complex response to stress situations in the cell. It has been shown that one of the transducer-branches that activates UPR response, named IRE-1, is specifically activated after treatment *C. elegans* nematodes with Cry5Ba and it was proposed that cells have adapted the UPR pathway to promote cellular defense to the toxin by increasing phospholipid biogenesis [5]. IRE-1 is the most conserved branch of UPR in lower eukaryotes [15]; it is a transmembrane protein that has a dual function as kinase/endonuclease [11]. IRE-1 forms dimers that are activated by auto-phosphorylation and cleaves out the mRNA of the specific transcription factor XBP-1 in two sites, excising an intron of 23 nucleotides [11]. The activated form of XBP-1 has a role in regulating lipid biosynthetic enzymes and ER-associated degradation components [16,17].

We show here that the sequence of the *xbp1*-intron that is cleaved out by IRE-1 is conserved between *C. elegans* and *A. aegypti*. We also show that *xbp1*-intron is cleaved after larvae were intoxicated with Cry11Aa, suggesting that IRE-1 branch of UPR is activated by treatment with Cry11Aa toxin. The role of UPR in defense response against Cry11Aa toxin was demonstrated by

silencing the expression of IRE-1 and XBP-1 proteins by RNAi. Previously, we demonstrated that the silencing of another protein (P38 MAPK) could be performed in the mosquito larvae after feeding with the corresponding dsRNA encapsulated in Effectene-vesicles [4]. It is important to mention that the *ire-1* and *xbp-1* silenced larvae grew similar to the control larvae and they seem healthy under control conditions without toxin intoxication. In the case of *C. elegans* it was reported that mutant worms in *ire-1* gene were smaller than the wild type animals suggesting that this protein is important for the viability of the nematodes [5]. One advantage of RNAi vs. gene knockout is that in RNAi the expression of silenced protein is reduced but not completely eliminated, and sometimes this is an advantage to avoid lethal or non-healthy phenotypes. The 4th instar *ire-1* or in *xbp-1* silenced larvae were tested in bioassays with Cry11Aa toxin showing that they became more sensitive to Cry11Aa toxin action (Table 1).

In *C. elegans* it was reported that UPR is activated in response to MAPK p38 [5]. A mutation in p38 in *C. elegans* resulted in 100-fold increase in sensitivity to Cry5Ba toxin. In contrast a *C. elegans* mutant in *ire-1* became 13-fold more sensitive to Cry5B toxin, while the silencing of *xbp-1* resulted in 5.7 fold increase in sensitivity [5]. The differences in sensitivity to Cry5B between the *ire-1* and p38 mutants suggest that MAPK p38 activates other defense mechanisms besides UPR. In the case of the mosquito *A. aegypti* the silencing of p38 resulted in 10 fold increase in sensitivity [4] while the silencing of *ire-1* or *xbp-1* resulted in 2.6 and 3.1 fold increase in susceptibility to Cry11Aa, respectively, suggesting that both p38 and UPR pathways are participating in the defense mechanisms in the mosquito. It remains to be determined if UPR activation is part of the response that is activated by p38 MAPK pathway in *A. aegypti*.

Insects cannot synthesize cholesterol so they have the requirement to eat incorporated sterols in their diet. However the SREBP pathway is highly conserved in insects where it is involved in lipid metabolism. In *Drosophila melanogaster* a single SREBP gene was reported as well as single orthologous genes for S1P, S2P and SCAP [18,19]. Mutants in these genes can be rescued by supplementing their diet with fatty acids [20]. It was reported that in mammals, caspase 1 is involved in activation of SREBP pathway. In the case of *D. melanogaster*, Caspase-Drice was shown to be involved in the activation of SREBP [14]. We identified caspase-1 (Q16MZ1) from *A. aegypti* to correspond to caspase-Drice from *D. melanogaster*. The silencing of Caspase-1 (Q16MZ1), S2P and SCAP in *A. aegypti* did not affect viability of the larvae neither their susceptibility to Cry11Aa toxin suggesting that SREBP pathway does not play a major role in defense mechanism against Cry11Aa pore forming toxin. These data are in contrast to the previous report that clearly showed that in mammalian cells SREBP pathway has an important role in a defense mechanism against the action of aerolysin pore forming toxin [7]. However, it is important to mention that it was reported that dScap and dS2P, which are essential components of the SREBP activation machinery in mammalian cells, are dispensable in *D. melanogaster* owing to different compensatory mechanisms [21]. This could also be the case of Scap and S2P in *A. aegypti* since larvae that were silenced in these genes were viable such a *Drosophila* flies that lack dSCAP and dS2P which are viable and are able to cleave dSREBP. Due to the fact that SREBP system in mosquitoes is more related to *D. melanogaster* than to mammals, it is possible that compensatory mechanisms may also be present in *A. aegypti*. Thus, the silencing of these individual genes would not prevent the complete cleavage of SREBP and it would not be possible to correlate the silencing of expression of these genes with the complete blocking of the

SREBP pathway. Matthews *et al.* (2010) [21] proposed two alternative means of activating SREBP in flies: the first, requiring cleavage of SREBP by the caspase-Drice, would explain the survival of flies lacking dS2P, and the second, suggest that SREBP cleavage could be done by dS1P and dS2P in a subset of tissues in the absence of dSCAP. Due to these arguments, we cannot conclude that SREBP pathway does not play a role in the defense mechanism against pore forming Cry11Aa toxin in *A. aegypti* and more experiments should be done in the future.

4. Experimental Section

4.1. Production of Cry11Aa Crystal Inclusions

For the production of Cry11Aa crystals, acrySTALLIFEROUS Bti strain Q2-81 containing plasmid pGC6 [22] were cultured for 3 days at 29 °C in Petri-dishes containing solid nutrient broth sporulation medium supplemented with erythromycin (25 µg/mL). Crystal inclusions were observed under phase contrast microscopy and the spores and inclusion bodies were harvested and washed three times with 0.3 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 8.0. Finally, crystal/spore samples were suspended in water supplemented with 1 mM PMSF.

4.2. RNA Interference (RNAi) Assays

The midgut tissue of 30 larvae in the early 4th instar were dissected and stored at -80 °C in RNAlater (QIAGEN, Hilden, Germany). Total RNA was purified using RNeasy Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). The RNA was quantitated in a NanoDrop2000 Thermo Scientific spectrophotometer, (Frankfurt, Germany). First strand cDNA was synthesized using 1 µg of total RNA and oligo dT as described in the Synthesis SuperScript II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Selected genes were: Ire-1 (Uniprot accession: XM_001655187.1); Xbp-1 (Uniprot: Q179N5, accession: XM_001651044.1); Cas-1 (Uniprot: Q16MZ1, accession: XM_001655826.1); Scap (Uniprot: Q17N28, accession: XM_001651241.1); S2P (Uniprot: Q16J11, accession: XM_001663618.1). Fragments from each selected gene were amplified from *A. aegypti* cDNA using the sense and antisense primers described in Table 3, which contain *EcoRI* and *HindIII* restriction sites at their 5' ends. The sequence of these PCR products was verified by DNA sequence in the facilities of Institute of Biotechnology, UNAM. The PCR products were digested with *EcoRI* and *HindIII* restriction enzymes and cloned into pLitmus28i vector (HiScribe™, New England Biolabs, Beverly, MA, USA) containing two T7 promoters flanking the multi-cloning site. Ligation mixtures were transformed into TOP10 *Escherichia coli* cells and selected in Luria broth medium supplemented with 100 µg/mL ampicillin. The pLitmus28i plasmids containing each of the selected genes were purified using QIAprep Miniprep Kit (QIAGEN). Each of the selected genes was then amplified by PCR using T7 oligonucleotides and the PCR product was purified with MiniElute columns (QIAGEN). *In vitro* transcription of both DNA strands of the insert was performed with T7 RNA polymerase using the HiScribe RNAi Transcription Kit (New England Biolabs) as reported by the manufacturer, yielding dsRNA.

For RNA silencing, 300 neonate larvae were fed during 16 h with 2.5 µg of dsRNA per larvae previously encapsulated with Effectene transfection reagent (QIAGEN) in a total volume of 15 mL.

After 16 h of feeding the final volume was adjusted to 1 L with dechlorinated water and fed with regular diet until they reached the 4th instar when bioassays were performed or guts were dissected for RT-PCR analyses.

4.3. RT-PCR and Quantitative Real Time PCR

Total RNA was isolated and cDNA was synthesized as described above from control larvae or from larvae that were feed with dsRNA of each gene. Specific oligonucleotides (Table 3) were used to amplify by RT-PCR each *A. aegypti* gene. Amplification of tubulin alpha chain (Uniprot: Q1HR53, accession: XM_001652094.1) or rps3 (Uniprot: J9HFW1, accession: XM_001658973) were used as controls. Amplified products were observed in 2% agarose gel and intensity of the bands was determined by densitometry using ImageJ program. For analysis of *xbp-1* splicing, electrophoresis was performed in 4% agarose gels at 110 V. Tunicamycin was used at 10 µg/mL during 2 h. Quantitative real-time PCR was performed on each template using primers listed in Table 3, on a Light Cycler 480 Instrument (Roche, Basel, Switzerland) using Sybr Green I Detection System (Fermentas, Life Sciences, Waltham, MA, USA). Relative-fold calculations were made with triplicates for each treatment-group analyzing *rps3* (ribosomal protein S3) gene to normalize gene expression.

Table 3. Sequence of oligonucleotides.

Gene	Oligonucleotide sequence	PCR product size (bp)
S2P	5'-CCG GAA TTC AAC ATT CGG AAG GTG ATT GA-3'	172
	5'-CCC AAG CTT GGT GGC CAA TGT AGA TAA CG-3'	
SCAP	5'-CCG GAA TTC GTG GGA TAA GTC GTT CGA TG-3'	192
	5'-CCC AAG CTT TCA TGA AGC CTC TTT GGA AG-3'	
CASP1Q16	5'-CCG GAA TTC TAT CTG TAT GCA AAG GA-3'	268
	5'-CCC AAG CTT ATG AGT AGA ATC CCG GAA TG-3'	
XBP-1	5'-CCG GAA TTC TCA ACG ATC TTC AGC AGC AC-3'	264
	5'-CCC AAG CTT TGT AGA GCA GGC AGA GAG CA-3'	
IRE-1	5'-CCG GAA TTC TGC TGT TGC AAA AGA TGA GG-3'	220
	5'-CCC AAG CTT CTC AGG ATT CCG GTA CGT GT- 3'	
TUBULIN	5'-CTA CGG CAA GAA GTC CAA GC-3'	243
	5'-GAA GCG GTG ATC GAA GAG AC-3'	
RPS3	5'-TTC TCG GCG TAC AGC TCG ACG-3'	239
	5'-GGC ATG TTC CGT GCT GAA TTG AAC G-3'	

4.4. Insect Bioassays

To determine the mean lethal concentration (LC₅₀) of Cry11Aa, ten early 4th instar *A. aegypti* larvae reared at 28 °C, 87% humidity and 12:12 light: dark period were placed in 100 mL dechlorinated water. Cry11Aa spore-crystal suspensions (from 50 to 3000 ng/cm²) were directly added to the 100 mL H₂O. Mortality was recorded after 24 h and lethal concentration (LC₅₀) values were estimated by Probit (Polo-PC LeOra Software, Petaluma, CA, USA) using data of three repetitions. Protein concentration was determined by the Bradford assay.

4.5. Phylogenetic Analysis

The virtual translations of *cas-1* gene sequences from different insects and also the *cas-1* from humans were aligned using Muscle 3.7 alignment [23]. A maximum likelihood tree was constructed and drawn using PhyML version 3.0 [24] with a bootstrap of 500 replicates.

5. Conclusions

The data presented here show that in *A. aegypti*, UPR is involved in the defense mechanism against CryIIA toxin. The identification of this defense mechanism to Cry toxins is likely to provide cellular targets to improve the insecticidal activity of these important biotechnological and useful toxins.

Acknowledgments

We thank Lizbeth Cabrera, Blanca Ines García-Gómez and Jorge F. Sanchez-Quintana for technical assistance. This work was supported by grants from CONACyT 128883; DGAPA-UNAM IN201113; and NIH 1R01 AI066014.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Pardo-López, L.; Soberón, M.; Bravo, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol. Rev.* **2013**, *37*, 3–22.
2. James, C. *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops 2011*; The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA): Metro Manila, Philippines, 2011.
3. Aroian, R.; van der Goot, F.G. Pore forming toxins and cellular non-immune defenses (CNiDs). *Curr. Opin. Microbiol.* **2007**, *10*, 57–61.
4. Cancino-Rodezno, A.; Alexander, C.; Villaseñor, R.; Pacheco, S.; Porta, H.; Pauchet, Y.; Gill, S.S.; Soberón, M.; Bravo, A. The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *40*, 58–63.
5. Bischof, L.J.; Kao, Ch-Y.; Los, F.C.O.; Gonzalez, M.R.; Shen, Z.; Briggs, S.P.; van der Goot, F.G.; Aroian, R.V. Activation of the unfolded protein response is required for defenses against bacterial pore forming toxin *in vivo*. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e1000176.
6. Kao, Ch-Y.; Los, F.C.O. Huffinan, D.L.; Wachi, S.; Kloft, N.; Husmann, M.; Karabrahimi, V.; Schwartz, J.-L.; Bellier, A.; Ha, Ch.; *et al.* Global functional analyses of cellular responses to pore-forming toxins. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1001314.
7. Gurcel, L.; Abrami, L.; Girardin, S.; Tschopp, J.; van der Goot, F.G. Caspase-1 Activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell* **2006**, *126*, 1135–1145.
8. Cancino-Rodezno, A.; Porta, H.; Soberón, M.; Bravo, A. Defense and death responses to pore forming toxins. *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.* **2009**, *26*, 65–94.

9. Gonzalez, M.R.; Bischofberger, M.; Freche, B.; Ho, S.; Parton, R.G.; van der Goot, F.G. Pore forming toxins induce multiple cellular responses promoting survival. *Cell Microbiol.* **2011**, *13*, 1026–1043.
10. Gutierrez, M.G.; Saka, H.A.; Chinen, I.; Zoppino, F.C.M.; Yoshimori, T.; Bocco, J.L.; Colombo, M.I. Protective role of autophagy against *Vibrio cholerae* cytolysin, a pore-forming toxin from *V. cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 1829–1834.
11. Walter, P.; Ron, D. The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **2011**, *334*, 1081–1086.
12. Brown, M.S.; Goldstein, J.L. The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **1997**, *89*, 331–340.
13. Calfon, M.; Zeng, H.; Urano, F.; Till, J.H.; Hubbard, S.R.; Harding, H.P.; Clark, S.G.; Ron, D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **2002**, *415*, 92–96.
14. Amameh, B.; Matthews, K.A.; Rawson, R.B. Activation of Sterol regulatory element-binding protein by the caspase Drice in *Drosophila* larvae. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 9674–9682.
15. Mori, K. Signaling pathways in the unfolded protein response: Development from yeast to mammals. *J. Biochem.* **2009**, *146*, 743–750.
16. Reimold, A.M.; Iwakoshi, N.N.; Manis, J.; Vallabhajosyula, P.; Szomolanyi-Tsuda, E.; Gravalles, E.M.; Friend, D.; Grusby, M.J.; Alt, F.; Glimcher, L.H. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* **2001**, *412*, 300–307.
17. Sriburi, R.; Jackowski, S.; Mori, K.; Brewer, J.W. XBP1: A link between unfolded protein response, lipid biosynthesis and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **2004**, *167*, 35–41.
18. Theopold, U.; Ekengren, S.; Hultmark, D. HLH106, a *Drosophila* transcription factor with similarity to the vertebrate sterol responsive element binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 1195–1199.
19. Seegmiller, A.C.; Dobrostskaya, I.; Goldstein, J.L.; Ho, Y.K.; Brown, M.S.; Rawson, R.B. The SREBP pathway in *Drosophila*: Regulation by palmitate, not sterols. *Dev. Cell* **2002**, *2*, 229–238.
20. Kunte, A.S.; Matthews, K.A.; Rawson, R.B. Fatty acid auxotrophy in *Drosophila* larvae lacking SREBP. *Cell Metab.* **2006**, *3*, 439–448.
21. Matthews, K.A.; Ozdemir, C.; Rawson, R.B. Activation of sterol regulatory element binding proteins in the absence of Scap in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **2010**, *185*, 189–198.
22. Chang, C.; Yu, Y.M.; Dai, S.M.; Law, S.K.; Gill, S.S. 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.* **1993**, *59*, 815–821.
23. Edgar, R.C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acid Res.* **2004**, *32*, 1792–1797.
24. Guindon, S.; Dufayard, J.F.; Lefort, V.; Anisimova, M.; Hordijk, W.; Gascuel, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **2010**, *59*, 307–321.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Anexo 3. Colaboración de la estudiante en capítulos de libro

Protein-protein interaction detection on membrane supports

Flores-Escobar B., Zuniga-Navarrete F., Sanchez J., Gomez I. 2012.

Gomez I. (Ed.) Tools to Understand Protein-Protein Interactions.

Kerala. Transworld Research Network. 55-70pp

Mode of action of insecticidal *Bacillus thuringiensis* toxin proteins and control of mosquitoes that transmit human pathogens.

Soberón M., Gómez I., García-Gómez B., Carmona D., Ocelotl J., Villanueva F., Zuniga F., **Flores B.**, Bravo A. 2013

Deshpande M. V., Ruiz Herrera J. (Eds.) Biotechnology: Beyond and Borders.

Proceedings of the Indo – Mexico Workshop. 279 288 pp.



Transworld Research Network
37/661 (2), Fort P.O.
Trivandrum-695 023
Kerala, India

Tools to Understand Protein-Protein Interactions, 2012: 55-70 ISBN: 978-81-7895-552-0
Editor: Isabel Gómez

4. Protein-protein interaction detection on membrane supports

Biviana Flores-Escobar, Fernando Zúñiga-Navarrete, Jorge Sánchez
and Isabel Gómez

Depto. de Microbiología Molecular. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, México. 62210, Mexico

Abstract. Despite the large number of advanced techniques that are currently available for studying protein–protein interactions, far-Westerns (Far WB) or blot overlays are still very commonly used in the average laboratory setting due to their powerfulness. This is due to the simplicity and clarity in the results that they produce.

In principle, a Far WB is similar to a Western blot. For both procedures, samples are run on SDS-PAGE gels, transferred to nitrocellulose or PVDF, and then overlaid with a soluble protein that may bind to one or more immobilized proteins on the blot. In the case of a Western blot, the overlaid protein is antibody. In the case of a Far WB, the overlaid protein is a probe of interest, often a fusion protein that is easy to detect. The overlaid probe can be detected either via incubation with an antibody, via incubation with streptavidin (if the probe is biotinylated) or via autoradiography if the overlaid probe is radiolabeled with ^{32}P .

Compared with other biochemical binding assays, Far WB allows prey proteins to be endogenously expressed without purification.

Correspondence/Reprint request: Dr. Isabel Gómez, Depto. de Microbiología Molecular. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, México. 62210, Mexico
E-mail: isabelg@ibt.unam.mx

Unlike most methods using cell lysates (e.g., co-immunoprecipitation (co-IP)) or living cells (e.g., fluorescent resonance energy transfer (FRET)), Far WB determines whether two proteins bind to each other directly. Furthermore, in cases where they bind to each other indirectly, Far WB allows the examination of candidate protein(s) that form a complex between them. Typically, 2–3 days are required to carry out the experiment.

Introduction

The study of protein–protein interactions is vital to understand how proteins function within a cell. A variety of approaches for detecting protein–protein interactions have been developed in the past two decades. Generally, they are divided into *in vivo* and *in vitro* approaches. Commonly used *in vivo* approaches include two-hybrid systems, using bacteria, yeast or mammalian cells as host; fluorescence resonance energy transfer (FRET) and bioluminescence resonance energy transfer (BRET), using living cells; and the synthetic lethality method in yeast. There are numerous *in vitro* approaches, such as tandem affinity purification and mass spectrometry, surface plasmon resonance (SPR), protein microarray, dot blotting, co-immunoprecipitation (co-IP) using cultured cells or tissues and pull-down assays using glutathione *S*-transferase (GST), His or FLAG tags (2,9).

Far WB was originally developed to screen protein expression libraries with ³²P-labeled GST-fusion proteins. The technique has now been used to study protein–protein interactions, for example, receptor–ligand interactions, and to screen interacting partners in a library. The major advantages of Far WB are that (i) it allows a prey protein to be endogenously expressed in cells; this is particularly meaningful when prey proteins are difficult to purify, and (ii) it enables one to determine whether two proteins directly bind to each other and, if not, whether a third protein mediates the physical complexing between them. The major disadvantages are that at least one protein should be purified to certain amounts and that there may be some nonspecific binding (9).

Questions that can be answered by far-Westerns to investigate protein–protein interactions are, but not limited to: (i) identify binding partners of a bait protein; (ii) confirm one-to-one protein–protein interactions resulting from high-throughput screening or other methods. It can also be used to study the effect of post-translational modifications on protein–protein interactions, examine interacting domain using synthetic peptides as probes and identify protein–protein interactions without using antigen-specific antibodies (2-4).

Protein blotting has been evolving constantly, since its inception, and now the scientific community is faced with a multitude of ways and means of transferring proteins. Nonetheless, western blot sensitivity is dependent on

efficiency of blotting or transfer, retention of the proteins during processing, and the final detection/amplification system used. Results are compromised if there are deficiencies in any of these steps. Far WB can be performed in a laboratory in which facilities for protein purification and standard WB are available.

Experimental design

A "typical" Far WB starts with electrophoretic separation of the protein(s) of interest, also referred to as prey proteins (that can be purified protein or cell lysate of bacteria, yeast, insect or mammalian cells, which are endogenously/heterologously expressing the prey protein), by SDS-PAGE for denaturing conditions. There are no particular requirements with respect to how to prepare cell lysates. Each Far WB experiment needs 0.2–1.0 μg of each purified protein or 10–100 μg of cell lysates. The required amounts vary depending on protein purity and the expression level of the prey protein; over-expressed prey protein is preferred if the endogenous protein level is too low or if specific antibodies are not available. Bait protein can be purified from any organism. The protein partner that is the easiest to purify should be chosen as bait. Each Far WB experiment needs 1–10 μg of the bait protein, though the prey–bait binding strength and antibody sensitivity may affect the amount of the bait protein used (2). The proteins are then loaded onto precast polyacrylamide gels and electric current causes the proteins to separate based primarily on size. Once separated, the proteins are transferred to a solid membrane support made of nitrocellulose or PVDF, usually by electroblotting. The membrane is then incubated in a blocking solution containing a mixture of proteins known to not interact or interfere (e.g., skim milk, BSA, or gelatin) in order to "block" the unoccupied sites on the membrane. The blot is then incubated with the probing protein of interest (Figure 1). Because a Far WB is composed of a series of linked techniques skill to perform, failure to capture signal can be caused by many factors (1). Some of these factors are resumed in Table I.

Immobilizing supports for protein transfer

A wide range of solid phases is available for immobilization, but the most common phases used for blotting comprise microporous surfaces and membranes such as cellulose, nitrocellulose (NC), polyvinylidene difluoride (PVDF), cellulose acetate, polyethane sulfone, and nylon. The unique properties of microporous surfaces that make them suitable for traditional assays such as western blotting are (a) large volume-to-surface area ratio, (b)

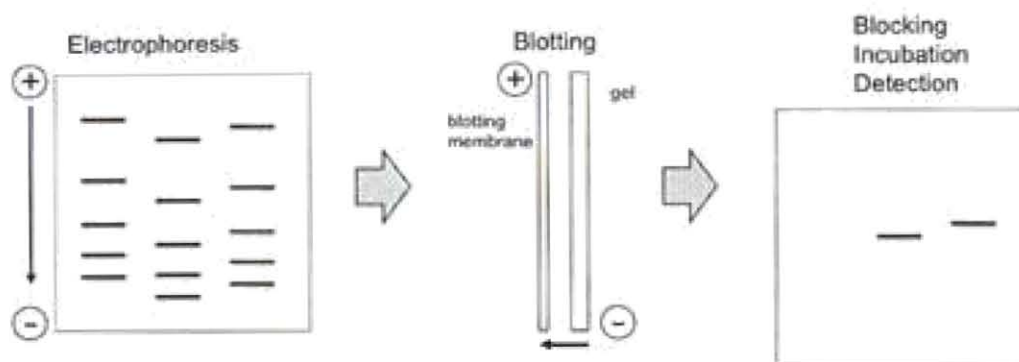


Figure 1. Esquematic of Far western blotting and detection.

Table I. Factors that affect Far WB results.

Factor	Variable characteristic
Target protein	Conformation, stability, available epitope(s), size.
Polyacrylamide gel	Percent polyacrylamide, age, lot
Membrane	Manufacturer, type
Blocking buffer	Protein type, concentration, cross-reactivity
Washes	Buffer, volume, duration, frequency
Substrate	Sensitivity, manufacturer
Detection method	Film age, imaging instrument manufacturer, exposure time

high binding capacity, (c) short- and long-term storage of immobilized molecules, (d) ease of processing by allowing a solution phase to interact with the immobilized molecule, (e) lack of interference with the detection strategy, and (f) reproducibility. These properties are useful for the high-throughput assays used in the postgenomic era as well. Typically, these microporous surfaces are used in the form of membranes or sheets with a thickness of 100 μm and possessing an average pore size that ranges from 0.05 to 10 μm in diameter. The interaction of biomolecules with each of these membranes is not completely understood, except for the fact that it is generally known to be noncovalent (5).

Membrane choice

Nitrocellulose and polyvinylidene fluoride (PVDF) are two commonly used membranes. Nitrocellulose membranes are cheaper than PVDF and are good for general purposes, but are far more fragile and do not stand up well

for repeated probing. Because binding to membrane occurs primarily through hydrophobic bonds and PVDF is more hydrophobic, it would bind proteins more tightly than nitrocellulose membranes. Thus, PVDF is a better choice when the transferred protein is small and at low amounts. In table II are resumed the principal characteristic, advantages and disadvantages of the most common membranes used in protein transfer.

Table II. Membrane supports for protein transfer.

Membrane	Stained method	Disadvantages
Nitrocellulose (NC)	Amino black, Coomassie brilliant blue, Ponceau, Fast green or Toluidine blue	Cannot be stripped and reprobated multiple times owing to its fragile nature. Small proteins tend to move through NC membranes and only a small fraction of total amount binds.
Polyvinylidene Difluoride (PVDF)	Amino black, India ink, Coomassie brilliant blue or silver nitrate	
Nylon Membranes		The high binding capacity produces higher nonspecific binding

Buffers used in transfer protocols

Commonly used buffers for western blotting are (a) Towbin system buffer [25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol (v/v), none to 0.01% SDS] and (b) CAPS buffer system [CAPS: 10 mM 3-(cyclohexyl-amino)-1-propanesulfonic acid, 10% methanol (v/v), pH 11] for transfer to PVDF popularized by Matsudaira for use prior to in situ blot sequencing. Transfer buffers without SDS are better, in general, when using Immobilon-P, since proteins have been reported to pass through the plane of the membrane in the presence of SDS. However, for proteins that have a tendency to precipitate, SDS should be in the buffer (<0.01%) during the transfer, and then one must fine-tune transfer time, current, etc. The Towbin system is used widely for applications that require immunodevelopment while the low ionic strength buffer system of Matsudaira allows rapid transfer (ca. 10 min) and prevents introduction of additional Tris and glycine that is detrimental to sequence analysis using PVDF membranes.

Methanol, introduced originally by Towbin, is typically present in the transfer buffer and aids in stripping SDS from proteins transferred from denaturing SDS-containing polyacrylamide gels. It stabilizes the geometry of the gel during the transfer process, and tends to increase the binding capacity of NC for protein as well as helps proteins to bind better to NC membrane. Methanol can be eliminated completely from transfer buffer when using Immobilon-P membranes as well as NC. Ten to fifteen percent methanol is suggested for general protein transfer (standard Towbin buffer used 20% methanol). Methanol shrinks the gel, and therefore when transferring high molecular weight proteins (>150,000) best results are obtained without added methanol. Nonmethanolic transfer is also advised when enzyme activity needs to be preserved as well as when transferring conformation-sensitive antibodies. PAGE gels tend to swell in low ionic strength buffers in the absence of methanol. The "bands" may become distorted if this swelling is allowed to occur during protein transfer. Preswelling of the gel by incubating it in transfer buffer for 30 min to 1 h prior to transfer has been shown to prevent this problem (5,6).

Note on transfer of large and small proteins

The balance of SDS and methanol in the transfer buffer, protein size, and gel percentage can affect transfer efficiency. The following modifications will encourage efficient transfer.

Large proteins (>100 kDa)

1. For large proteins, transfer out of the gel may be very slow, just as they run slowly within the gel during separation. If blotting a large protein, be sure to run your samples in a low-concentration gel, 8% or less. These will be very fragile, so handle carefully.
2. Large proteins will tend to precipitate in the gel, hindering transfer. Adding SDS to a final concentration of 0.1% in the transfer buffer will discourage this. Methanol tends to remove SDS from proteins, so reducing the methanol percentage to 10% or less will also guard against precipitation.
3. Lowering methanol in the transfer buffer also promotes swelling of the gel, allowing large proteins to transfer more easily.
4. Methanol is only necessary if using nitrocellulose. If using PVDF, methanol can be removed from the transfer buffer altogether, and is only needed to activate the PVDF before assembling the gel/membrane sandwich.
5. Choose wet transfer overnight at 4°C instead of semi-dry transfer.

Small proteins (<100 kD)

1. All proteins are hindered from binding to membranes by SDS but small proteins more so than large proteins. If your protein of interest is small, consider removing SDS from the transfer buffer.
2. Keep the methanol concentration at 20%.

Techniques to transfer proteins from gel to membrane

Protein transfer from native or sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) gels to nitrocellulose or PVDF membranes can be achieved in three different ways:

- a) Simple diffusion;
- b) Vacuum blotting; and
- c) Electroblotting.

Simple diffusion

Blotting by diffusion was a procedure developed originally for transferring proteins separated by iso-electric focusing on thin gels to membranes that was later expanded to other gel systems. In this procedure a membrane is placed on the surface of the gel with a stack of dry filter papers on top of the membrane. A glass plate and an object with a certain weight are usually placed on this assembly to facilitate the diffusion process. However, this protocol had not gained widespread acceptance owing to the fact that there was no quantitative transfer of protein. A waning interest in diffusion transfer was resuscitated when it was shown that it was possible to obtain up to 12 blots from a single gel by sandwiching it between two membranes sequentially. Membrane lifts from SDS–PAGE gels for immunoblotting using this method are very useful in mass spectrometric identification of proteins. Following diffusion blotting the gel can be stained with CBB. The antigens on the blot are detected by immuno-staining and the immunoblotted target band can be compared with the CBB stained gel by superimposing the blot and the stained gel, allowing the identification of the band to be excised for tryptic digestion for subsequent mass spectrometric analysis. The greatest advantage of diffusion blotting compared to electroblotting is that several transfers or imprints can be obtained from the same gel and different antisera can be tested on identical imprints.

Subsequently, quantitative information regarding protein transfer during diffusion blotting was obtained using ^{14}C labeled proteins. A 3-min diffusion blotting was shown to give a transfer of 10% compared to electroblotting.

Diffusion blotting of the same gels carried out multiple times for prolonged periods at 37 °C causes the gel to shrink. This can be overcome by using gels cast on plastic supports.

Activity gel electrophoresis or zymography has also been studied with regard to the utility of diffusion. This involves the electrophoresis of enzymes (either nucleases or proteases) through discontinuous polyacrylamide gels containing enzyme substrate (either type III gelatin or B-casein). After electrophoresis, SDS is removed from the gel by washing in 2.5% Triton X-100 solution. This allows the enzyme to renature, and the substrate is degraded. Staining of the gel with CBB (in the case of proteins) allows the bands of enzyme activity to be detected as clear bands of lysis against a blue background. In this procedure an additional immunoblotting analysis using another gel is often required to examine a particular band that is involved. Diffusion blotting has been used to circumvent the use of second gel for this purpose. The activity gel was blotted onto PVDF for immunostaining and the remaining gel after blotting was used for routine "activity staining." Since the blot and the activity staining are derived from the same gel, the signal localization in the gel and the replica can be easily aligned for comparison. Diffusion blotting transfers 25-50% of the proteins to the membrane compared to electroblotting. However, the advantage of obtaining multiple blots from the same gel could outweigh the loss in transfer and actually could be compensated for by using sensitive detection techniques.

The gel remains on its plastic support, which prevents stretching and compression; this ensures identical imprints and facilitates more reliable molecular mass determination. If only a few imprints are made, sufficient protein remains within the gel for general protein staining. These advantages make diffusion blotting the method of choice when quantitative protein transfer is not required (3,4).

Vacuum blotting

A simple blotting method was developed as an alternative to diffusion blotting and electroblotting. The suction power of a pump connected to a slab gel dryer system was used to drive the separated polypeptides from the gel to the nitrocellulose membrane. Both low and high molecular weight proteins could be transferred using this method. When using low molecular weight proteins, nitrocellulose membranes with a small pore size (0.2 or 0.1 μm) should be used, since small molecular weight proteins (14,000 Da) are less adsorbed by the 0.45 μm membrane.

The gel can dry if the procedure is carried out over 45 min and enough buffer should be used in such cases. In some cases low concentration

polyacrylamide gels stuck to the membrane following transfer. Rehydrating the gel helps detaching the nitrocellulose membrane from the gel remnants in such a scenario (7,8).

Electroblotting

Electroblotting is the most commonly used procedure to transfer proteins from a gel to a membrane. The main advantages are the speed and the completeness of transfer compared to diffusion or vacuum blotting. Electroelution can be achieved either by (a) complete immersion of a gel-membrane sandwich in a buffer (wet transfer) or by (b) placing the gel-membrane sandwich between absorbent paper soaked in transfer buffer (semi-dry transfer) (3,4).

Wet transfer

In this procedure, the sandwich is placed in a buffer tank with platinum wire electrodes. A large number of different apparatus are available to efficiently transfer proteins (or other macromolecules) transversely from gel to membrane. Most of these, however, are based on the design of Towbin et al.: i.e., they have vertical stainless steel-platinum electrodes in a large tank (3,4).

Semi-dry transfer

In "Semi-dry" transfer, the gel-membrane sandwich is placed between carbon plate electrodes. "Semi-dry" or "horizontal" blotting uses two plate electrodes (stainless steel or graphite-carbon) for uniform electrical field over a short distance, and sandwiches between these up to six gel/membrane/filter paper assemblies, all well soaked in transfer buffer. The assembly is clamped or otherwise secured on its side, and electrophoretic transfer effected in this position, using as transfer buffer only the liquid contained in the gel and filter papers or other pads in the assembly.

The advantages to this procedure over the conventional upright protocol are (a) gels can be blotted simultaneously; (b) electrodes can be cheap carbon blocks and (c) less power is required for transfer (and therefore a simpler power pack) (3,4).

Blot incubation conditions

Regardless of the type of far WB being performed, the blot must be blocked in a noninteracting protein solution to block the unbound sites on the

membrane. As far as WB contain an extra incubation step with the probing protein, the choice of blocking solution is even more important to ensure that proteins in the solution do not cross-react with the probing protein.

Further considerations also ensure that the proteins in the blocking solution do not interact nonspecifically with the antibody/antibodies in the next step. The stability of the primary protein on the blot should also be considered during blocking; this may mean that the blot needs to be blocked with a higher concentration of blocking solution for a shorter period of time.

The type and composition of buffer that the probing protein is incubated in is also important and should be determined prior to incubation. Although the probing protein may be stable in certain buffers at extreme conditions (pH, ionic strength, etc.), whether the proteins on the blot are stable to such buffers should also be kept in mind. Additives to the buffers are also useful in reducing nonspecific interactions, but may also interfere with interactions between the proteins being studied. Common additives can include a small amount of the blocking protein to drive a higher specificity of the interaction through competition and mild detergents, such as Triton X-100 or Tween-20 (or -80), to reduce background interactions (2).

A summary of the factors important in favoring the interaction between proteins is presented in Table III.

Detection systems

Alkaline phosphatase

Alkaline phosphatase (AP, 140 kDa) used to be the enzyme of choice and was typically detected with precipitating chromogenic substrates. Colorimetric reactions proceed at a steady rate, allowing accurate control of relative sensitivity and reaction development. As protein research progressed, HRP (40 kDa) became more popular because of its stability and smaller size, which enables more molecules conjugated per IgG and greater sensitivity. Furthermore, chemiluminescent substrates for HRP enabled even higher sensitivity (1).

Colorimetric detection

Colorimetric or chromogenic substrates are perhaps the simplest and most cost-effective method of detection. When these substrates come in contact with the appropriate enzyme, they are converted to insoluble, colored products that precipitate onto the membrane and require no special equipment for processing or visualizing. Substrates such as TMB

Table III. Conditions to consider when optimizing Far WB.

Factor	Advantages/Disadvantages	Recommendations
Protein concentration	Higher protein concentration drives the interaction equilibrium to favor the interaction but too high forces nonspecific interactions and may contribute to background noise.	Empirically determined optimize total volume and total protein for the size of the blot.
Temperature	Stabilizes proteins but affects the kinetics of the interaction.	Room temperature if proteins are stable or else at 4°C.
Time of incubation	Provides time for the proteins to come into contact and the interaction to occur. Too lengthy incubation can result in protein degradation and/or cause nonspecific interactions that contribute to background noise.	1–3 hours at room temperature and approx. double at 4°C.
Ionic strength	Maintains near physiological conditions for the proteins. Also helps reduce nonspecific interactions due to electrostatic interactions.	~100–200 mM NaCl.
pH	Maintains stability of protein and keeps surface charge “native” in order to maintain physiological conditions for the interaction. Chaotropic agents can disrupt weak protein–protein interactions and be used to assess the affinity of the interaction.	Empirically determined but near 7.0 for most cases. Type of buffer is specific to each protein. Empirically determined.
Additives	Detergents at low levels reduce background interactions. Small amount of blocking protein drives the interaction specificity and reduces background interactions.	~0.02–0.05 % ~10-fold less than the concentration used for blocking.

(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), 4-CN (4-chloro-1-naphthol), and DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) are used with HRP. Substrates for AP include BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate-p-toluidine salt) and NBT (nitro-blue tetrazolium chloride), which yields an insoluble black-purple precipitate, and Fast Red (naphthol AS-MX phosphate+Fast Red TR salt). The performance of a particular substrate may vary dramatically when obtained from different suppliers because results can be affected by the concentration and purity of the substrate and by additives and buffer components that are a part of the formulation (1).

Fluorescence detection

Western blotting detection via fluorescence is typically performed when there are two different targets on a single blot and high sensitivity is required. Fluorescent dyes (often called “fluorophores” or simply “fluors”) are molecules whose chemical bonds excite when absorbing a photon of light at one wavelength, causing them to emit a photon of light at a longer wavelength (lower energy) as the molecule relaxes to the ground state. Small, chemically stable fluorophores that have convenient ranges of efficient (intense) excitation and emission wavelengths are useful as detectable chemical tags or labels for antibodies and other biomolecular probes.

Some fluorescence-based systems use fluorescent proteins (e.g., phycoerythrin) or bioluminescent reporter systems; however, these techniques are time-consuming, limited in their ability to detect multiple targets and do not typically provide the level of photostability and sensitivity offered by synthetic fluorescent dyes. Fluorescence techniques that use specific probes labeled with carefully selected sets of fluorescent dyes enable the detection of multiple targets and provide greater compatibility with a wide range of fluorescence instrumentation.

Although fluorescein, rhodamine, and amino-methyl-coumarin-acetate (AMCA) dyes are the traditionally used fluorophores, they have numerous limitations. Most notably, these traditional dyes have relatively low fluorescence intensity and tend to photobleach. A new generation of fluorophores has overcome such limitations and offers tremendous improvements in brightness, photostability, and pH sensitivity. These new fluorophores cover the entire visible spectrum and much of the infrared spectrum. When performing a fluorescent Western blot, typically low-fluorescence (treated) membranes are used because membrane polymers autofluoresce in the visible range of the spectrum, which can interfere with detection. Using fluors with nonoverlapping excitation–emission spectra is critical for identifying targets. A typical fluor pair includes Thermo Scientific DyLight Fluors 549 and 649 or the DyLight Near-infrared (IR) Fluors, 680 and 800. The near-IR fluors are especially useful because protein samples and membrane polymers are less likely to autofluoresce within these spectral ranges, resulting in lower background and higher sensitivity (1).

Chemiluminescence detection

The most popular Western blotting substrates are luminol-based and produce a chemiluminescent signal. Chemiluminescence is a chemical reaction that produces energy released in the form of light (Figure 2). In the

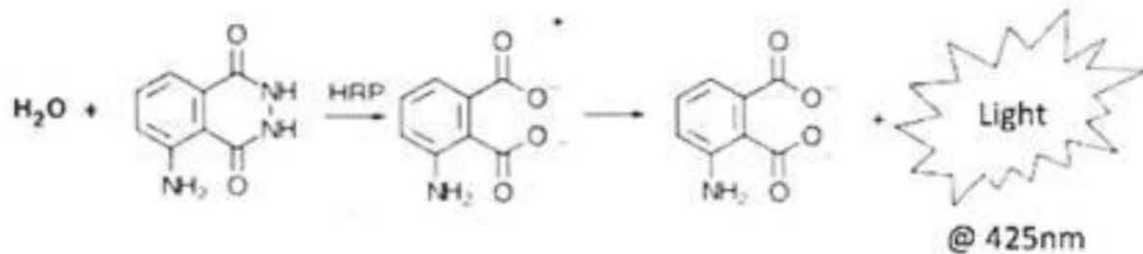


Figure 2. Chemiluminescence reaction scheme.

presence of HRP and a peroxide buffer, luminol oxidizes and forms an excited state product that emits light as it decays to the ground state. Light emission occurs only during the enzyme-substrate reaction and, therefore, once the substrate in proximity to the enzyme is exhausted, signal output ceases. In contrast, colorimetric substrates, such as TMB, produce precipitate that remains visible on the membrane even after the reaction has terminated (1).

Common problems

No signal

An initial exposure that fails to capture the chemiluminescent signal indicates a Western blotting system that requires optimization. Frequently, lack of signal is caused by too much enzyme (i.e., HRP) in the system. It may seem counterintuitive to use less enzyme conjugate when a signal cannot be detected; however, for successful signal documentation, the correct balance of enzyme and substrate must be present. Substrate oxidation by the enzyme is irreversible and, therefore, once the substrate is oxidized, it can no longer interact with the enzyme to generate light. Because enzyme activity persists, the substrate is the limiting factor and once exhausted, signal output ceases. Rarely, lack of signal is caused by an insufficient amount of active enzyme present. Too much or not enough enzyme can be caused by any of the factors involved in the Western blot system.

To produce a signal that can be captured, adjust the system's parameters. For reproducible results, prepare a new gel and apply less sample or titrate the antibodies. When optimizing antibody concentrations, image the blot twice: once immediately after adding the substrate and a second time at an interval (e.g., 1 h) after incubating the substrate. The second detection provides information about the optimal enzyme concentration and helps optimize parameters.

Also, if the initial exposure did not capture a signal, a second incubation in substrate may yield a signal if some HRP remains active. Stripping all

detection reagents from the blot and reprobing can save valuable sample while optimizing parameters. Perform an additional incubation in the substrate and strip the blot only to recover some information about the system. If blot-to-blot consistency or comparison is desired, the same conditions must be used and the same procedure must be followed each time the experiment is performed (1).

Signal fades quickly

When a particular system produces a chemiluminescent signal that fades quickly, the Western blotting system requires optimization, as described earlier. The good news is that a signal was obtained, indicating that the blot is almost optimized. Sometimes a particular system produces a signal that fades more quickly than usual although all parameters are the same. This type of result is minimized in a fully optimized system. A successful but suboptimal system is subject to the slight variations inherent to the method, such as transfer efficiency and changes in sample and antibody activity during storage and handling (1).

High background

High background signal is the result of either insufficient blocking, antibodies cross-reacting with the blocking proteins, or the use of too much enzyme conjugate. Researchers sometimes believe that a particular substrate causes background or can increase background. The substrate in itself typically does not produce signal without the enzyme being present. When using a substrate with greater sensitivity than what was previously used, high background often results if the parameters were not altered to compensate for the substrate's sensitivity. Using optimal concentrations of antibodies promotes target-specific binding and low background (1).

New bottle of substrate does not produce a signal

Occasionally, a signal cannot be captured when the only variable that has changed in a particular system is a new bottle or different lot of substrate. Typically, this result is caused by a Western blot system that has not been fully optimized. Western blotting substrates are inherently variable. Many manufacturers simply control for a minimum sensitivity, and it is possible that the new substrate is more sensitive than the previously used lot. In a fully optimized blotting system, substrate sensitivity variations, as well as other variables, are minor or unnoticeable (1).

Brown or yellow bands on the membrane

HRP becomes brown when it is oxidized and inactive. Within a given amount of enzyme conjugate, there always exists a portion that is oxidized. In an optimized system, the amount of oxidized HRP is miniscule and cannot be visualized on the blot. The appearance of yellow or brown bands indicates the presence of a large amount of HRP and, therefore, the oxidized and inactive portion is visible. A blotting system that results in yellow bands requires optimizing using much less enzyme conjugate.

Additionally, too much HRP in a localized area produces an abundance of free radicals during enzymatic activity. Free radicals can inactivate HRP and damage antibodies, target and the membrane, prohibiting effective reprobing (1).

Bands or entire blot glowing in the darkroom

If a pattern of bands or the entire blot is glowing after incubation in the substrate, then there is too much HRP present in the system. This occurrence indicates that further dilution of the secondary HRP-conjugated antibody is required and possibly the primary antibody as well. Too much enzyme can be caused by many of the factors involved in the Western blotting system. If the entire blot is glowing, optimization of blocking and washing also might be necessary (1).

Ghost/hollow bands

Protein bands that appear as a halo with no signal in the middle of the band or an entire band that appears white in a dark background are typically referred to as ghost bands. This result occurs when the substrate is depleted within the white area.

The specific cause of ghost bands is not well-understood. Therefore, we tested several factors that could contribute to this result. Our study, briefly described in the following sections, revealed that some common causes for ghost-band effects include applying too much target protein to the gel and using antibodies that cross-react with component(s) in the blocking solution.

Acknowledgments

The work in our group is supported by CONACyT contract: 83135 and DGAPA contract: IN209011. IG wants to special thankfully to L'Oréal-UNESCO-AMC fellowship.

References

1. Alegria-Schaffe, A., Lodge, A. and Vattem, K. (2009) Performing and Optimizing Western Blots with an Emphasis on Chemiluminescent Detection. *Methods in Enzymology*. 463:573-599.
2. Chan, C. S., Winstone, T. M. L. and Turner, R. J. (2008) Investigating Protein-Protein Interactions by Far-Westerns. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 110: 195-214.
3. Kurien, B. T. and Scofield, R. H. (2003) Protein Blotting: a Review. *J. Immunol Methods*. 274:1-15.
4. Kurien, B. T. and Scofield, R. H. (2006) Western Blotting. *Methods*. 38:283-293.
5. Kurien, B. T. and Scofield, R. H. (2009) Introduction to Protein Blotting. *Methods in Molecular Biology, Protein Blotting and Detection*. 536:9-22.
6. Machida, K. and Mayer, B. J. (2009) Detection of Protein-Protein Interactions by Far-Western Blotting. *Methods in Molecular Biology, Protein Blotting and Detection*. 536:313-329.
7. Manoussopoulos, I. N. and Tsagris, M. (2009) Native Electrophoresis and Western Blot Analysis: Methods and Applications. *Methods in Molecular Biology, Protein Blotting and Detection*. 536:277-287.
8. Sumi, S., Mathaia, A. and Radhakrishnan, V. V. (2009) Dot-Immunobinding Assay. *Methods in Molecular Biology, Protein Blotting and Detection*. 536: 89-93.
9. Wu, Y., Li, Q. and Chen, X. Z. (2007) Detecting Protein-Protein Interactions by Far Western Blotting. *Nature Protocols*. 2:3278-3284.

22. Mode of action of insecticidal *Bacillus thuringiensis* toxin proteins and control of mosquitoes that transmit human pathogens

*Soberon M., Gómez I., García-Gómez B., Carmona D., Ocelotl J., Villanueva F., Zuñiga F., Flores B., Bravo A.

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av Universidad No 2001 CP 62210 Ap postal 510-3 CP 62250, Cuernavaca Morelos, Mexico. *mario@ibt.unam.mx

Abstract

Bacillus thuringiensis (Bt) produces insecticidal Cry proteins that kill important crop pests and also vectors of human diseases. In particular a Bt strain isolated more than 40 years ago, Bt subs *israelensis* (Bti), is used world wide to control mosquito vectors of important human pathogens causing diseases such as malaria or dengue fever. Bti produces several Cry toxins of the three-domain family (3d-Cry) like Cry11Aa, Cry4Aa and Cry4Ba and also the non-related Cyt1Aa toxins. One interesting feature of Bti is that regardless of its extensive use worldwide for more than 25 year, no-resistance to Bti has so far been documented in the field. Also, that the combination of Cry and Cyt toxins produced by Bti show an important synergistic effect, since toxicity of individual toxins is far less than the combination of these proteins. Here, we summarize the mode of action of Bti Cry and Cyt toxins and also provide molecular basis of synergism. Further, we describe some of the most important applications of Bti in controlling insect vector worldwide.

Introduction

Bacillus thuringiensis (Bt) is a spore forming bacteria that produces insecticidal proteins upon sporulation. One of the most important applications of Bt toxins has been the use of Bt strains that show toxicity against larvae of mosquito species that transmit human diseases *viz.*, malaria and dengue fever. The most important Bt isolate is a Bt strain subs *israelensis* (Bti) that was isolated more than forty years ago and is used worldwide for the control of *Culex spp.*, *Aedes spp.* and *Anopheles spp.* (Bravo et al., 2011). Different Bt strains produce different Cry or Cyt toxins responsible for the insecticidal specificity of each Bt strain (Bravo et al., 2011). Bti produces at least four Cry toxins that belong to the three-domain

Cry (3d-Cry) family, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa and Cry11Aa, and two Cyt toxins, Cyt1Aa and Cyt2Ab (Crickmore et al., 1995). Both Cry and Cyt toxins are pore-forming proteins that lyse midgut cells by osmotic shock (Bravo et al., 2011). In the case of Cry toxins, their specificity relies in the binding of the toxins to larval midgut protein molecules called receptors (Piggot and Ellar, 2007). In contrast, no protein receptor molecules have been described for Cyt toxins and specificity is believed to be due to the recognition of specific lipids in the brush border membranes of midgut epithelial cells (Du et al., 1999).

Despite the extensive use of Bti in mosquito control worldwide for more than 30 years, there are no reports of emergence of resistance in field conditions (Bravo et al., 2011). Furthermore, one important characteristic feature of Bti toxins is their synergistic effect, since the toxicity of individual toxins is far lower than the mixture of these Cry and Cyt toxins (Chang et al., 1993; Wu et al., 1994; Wirth et al., 2000). The lack of resistance evolution to Bti and the synergism of Bti toxins is principally due to the presence of Cyt1Aa protein that is able to counter resistance of *C. quinquefasciatus* to Cry4 or Cry11A toxins and to synergize the toxicity of these Cry proteins in different mosquitoes species such as *Culex spp.*, *Aedes spp.* and *Anopheles spp.* (Wirth et al., 1997; Wirth et al., 2005). In this chapter, we will describe the mode of action of Bti Cry and Cyt proteins as well as the molecular basis of synergism among these proteins. Also, we will discuss the most important applications of Bti in mosquito control.

Mode of action of Bti Cry proteins

The Cry proteins produced by Bti belong to the 3d-Cry toxin family of Bt toxins. Members of this family of proteins share a similar three-dimensional fold regardless of the low amino acid sequence identity shared from different protein members. The three-dimensional structure of several 3d-Cry had been solved by X-ray crystallography including those of Cry4Aa and Cry4Ba from Bti (Boonserm et al., 2005; Boonserm et al., 2006).

Fig. 1 shows the three-dimensional structure of Cry4Aa. Domain I is a seven helix bundle that is involved in pore formation and oligomerization of the toxin, domain II is a beta-prism with exposed loop regions that are involved in the recognition of protein molecules in the insect midgut epithelium while domain III is a beta-sandwich also involved in receptor recognition (Bravo et al., 2011). The fact that different members of the 3d-Cry family share a similar fold suggests that they share a similar mechanism of action.



Fig. 1. Three-dimensional structure of Cry4Aa (Color plate 6)

The mode of action of 3d-Cry toxins has been primarily characterized in Lepidopteran insects and it is reviewed in the chapter of Bravo et al., 2013, in this book. The crystalline inclusions are solubilized in the larval gut where protoxins are proteolytically activated by midgut proteases to leave the three domain monomeric toxin. It has been shown that monomeric proteins undergo a sequential binding interaction with different midgut proteins such as glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) -anchored aminopeptidase-N (APN), alkaline phosphatase (ALP) and cadherin, leading to the formation of a pre-pore structure that inserts in to the membrane inducing pore formation and osmotic lysis of the midgut cells (Bravo et al., 2011).

Here we focus to review the different receptor molecules identified for the Cry proteins produced by Bti (Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11Aa) and discuss their role in the mode of action of these proteins.

***Bti* Cry toxins receptors**

The receptor molecules of mosquitocidal Cry toxins have been mainly characterized in *Aedes aegypti* vector of dengue fever and in *Anopheles gambiae* vector of malaria (Likitvivanavong et al., 2011). As in Lepidopteran insects Cry binding proteins in *Ae. aegypti* and *An. gambiae* include cadherin like proteins, APN and ALP molecules (Likitvivanavong et al., 2011). However, in *An. albimanus* a new receptor molecule that corresponds to GPI-anchored alpha-amylase was identified as Cry11Aa binding protein (Fernandez-Luna et al., 2010). Also, in *An. gambiae* GPI-

anchored alpha-amylase and alpha-glucosidase were identified as Cry11Ba binding molecules (Zhang et al., 2013). Cry11Ba is produced by Bt subs *jegathesan*. Interestingly, multiple GPI-anchored proteins seem to be involved in Cry11Aa and Cry4Ba in *Ae. aegypti* (Likitvivatanavong et al., 2011). In the case of Cry4Ba toxin, three APN isoforms and two ALP isoforms are involved in binding this toxin to brush border membranes of *Ae. Aegypti* and in toxicity (Saengwiman et al., 2011; Dechklar et al., 2011; Jimenez et al., 2012). In contrast, the Cry11Aa relies at least in one APN isoform and in one ALP isoform for binding to brush border membranes and toxicity to *Ae. Aegypti* (Fernández et al., 2006; Chen et al., 2009b). The precise role of all these GPI-anchored proteins in the mode of action still remains to be determined, but it has been proposed that they could have a dual role and participate on binding of Cry monomer during initial steps of toxin interaction with the membrane and also on oligomer binding facilitating membrane insertion (Arenas et al 2010).

In the case of *Ae. aegypti*, cadherin it was shown to be involved in Cry11Aa oligomerization (Chen et al., 2009a; Rodriguez-Almazán et al., 2012). However, Cry4Ba was shown to oligomerize in absence of cadherin receptor and silencing experiments further revealed that Cry4Ba does not rely on cadherin for toxicity in contrast to Cry11Aa, that lost toxicity against mosquito larvae when cadherin expression was silenced by RNAi (Rodriguez-Almazán et al., 2012). Interestingly cadherin was shown to be important for Cry4Ba in *An. gambiae* (Hua et al., 2008). The fact that similar GPI-anchored proteins and cadherin are involved in toxicity of Bti Cry toxins suggests that the mode of action of Cry toxins in mosquitoes is conserved where sequential binding of Cry toxins to multiple midgut proteins results in the formation of a pre-pore oligomer that inserts into the membrane killing cells by osmotic shock.

Mode of action of Bti Cyt1Aa

In the case of Cyt toxins, the three dimensional structure of three Cyt proteins has been solved. Cyt1Aa (Fig. 2) is a single α - β domain composed of two outer layers of α -helix hairpins wrapped around a β -sheet (Cohen et al., 2011). Cyt1Aa is synthesized as protoxin of 27 kDa that undergo proteolytic cleavage in the amino- and carboxyl-terminal ends yielding an activated toxin of 24 kDa. As mentioned above no protein receptor molecules have been identified for Cyt toxins and it was shown that Cyt interact with non-saturated membrane lipids (Du et al., 1999). The proteolytic activation of Cyt1Aa in the presence of membranes results in the formation of high molecular weight oligomers of more than 400 kDa that are



Fig. 2. Three-dimensional structure of Cyt1Aa (Color plate 6)

proposed to be formed by more than 16 monomers (Chow et al., 1989; Promdonkoy et al., 2000). In the case of Cyt1Aa it has been shown that the amino-terminal end that contains the region rich in alpha helices is involved in toxin oligomerization while the carboxyl-terminal end containing the beta-sheets is involved in membrane insertion (Rodriguez-Almazán et al., 2011). Recently it was shown that mutations in helix alpha-C of Cyt1Aa affected oligomer formation and membrane insertion and showed reduced hemolytic and insecticidal activity indicating that oligomerization is a crucial step for Cyt1Aa membrane insertion and toxicity (López-Díaz et al., 2013).

Synergism of Bti toxins

One of the most interesting features of Bti toxins is the synergism of Cry4 and Cry11Aa toxin with Cyt1Aa. It has been shown that Cyt1Aa synergizes the insecticidal activity of Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11Aa (Chang et al., 1993; Crickmore et al., 1995; Wirth et al., 2000). Moreover, Cyt1Aa counters resistance of *C. quinquefasciatus* populations that have developed resistance to Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11Aa (Wirth et al., 1997; Wirth et al., 2005). The molecular basis of synergism of Cyt1Aa was shown to rely in the binding interaction of Cyt1Aa with Cry11Aa or Cry4Ba and the epitopes involved in these interactions (Cantón et al., 2011). Interestingly, in the case of both Cry11Aa and Cry4Ba the exposed loop regions of domain II were

shown to be involved in Cyt1Aa binding. Domain II loop regions have also been shown to be involved in midgut receptor binding, specifically with ALP receptor, suggesting that Cyt1Aa may function as receptor of both toxins (Bravo et al., 2011). Mutations in the specific regions involved in the interaction between Cry and Cyt toxins affected severely their synergism without affecting their individual toxicity, suggesting that interaction among these proteins is extremely important for inducing the synergistic effect (Perez et al., 2005). In the case of Cry11Aa it was shown that Cyt1Aa facilitates Cry11Aa oligomerization, an important indication that Cyt1Aa functions as a receptor of Cry11Aa (Perez et al., 2007). Recently, it was shown that Cyt1Aa mutants located in helix α -C are non-toxic and are affected in oligomerization, and membrane insertion but they are still able to synergized Cry11Aa toxicity in *Ae. aegypti*, although the synergism was reduced compared to native Cyt1Aa (López-Díaz et al., 2013). This result suggests that the most efficient condition for Cyt1Aa synergistic activity is in its membrane bound state but Cyt1Aa could still enhance Cry11Aa toxicity in solution.

Applications of Bti

Bti is highly toxic to mosquitoes such like *Ae. aegypti*, vector of dengue fever, *Simulium damnosum*, vector of onchocearciasis and certain *Anopheles* species, vectors of malaria. Most of these mosquitoes populations had been traditionally controlled by chemical insecticides. However, resistance to these insecticides prompted the development of Bti as an alternative method to control mosquitoes and black flies populations. Besides this, Bti offers advantages to chemical control of vectors since it lacks toxicity to other organisms and also the lack of evolution of resistance to Bti in field conditions. The importance of Bti as an important way to control dipteran vectors came soon after its discovery in 1983, where a control program for the eradication of onchocearciasis was launched in eleven countries of Western Africa. This program was launched since the *S. damnosum* populations developed resistance to the larvicidal organophosphate (Bravo et al., 2010). Control of the disease was achieved protecting over 15 million children with more than 80% of the region is protected by Bti applications and 20% with temephos (Bravo et al., 2010).

Another important application of Bti was achieved for the control of *Ae. vexans* and *C. pipiens pipiens* mosquitoes in the Upper Rhine Valley in Germany. In summer, approximately 300 river kilometers and 600 km² inundation areas are treated with Bti. For more than 30 years over 170,000 hectares of mosquito breeding sites have been treated with different Bti

formulations. A reduction of over 90% of mosquito populations is achieved every year where comparable results had been obtained in United States and Southern Switzerland with the use of Bti formulations in these countries (Bravo et al., 2010). Regarding malaria, application of Bti formulation into the Yangtze river in China had reduced malaria incidence 90% due to the control of *An. sinensis* and *An. anthropophagus* populations (Bravo et al., 2010). Finally, in Brazil the outbreak of *Ae. aegypti* resistant populations to chemical insecticides in Rio de Janeiro and Sao Pablo led to the application of Bti formulations for mosquito control (Bravo et al., 2010).

Conclusions

Bti produces a battery of toxins with diverse and complex mode of action. The combination of these toxins results in high toxicity against vectors of human disease pathogens. No resistance to Bti has developed in the field and its specificity to their target insect makes this bacterium an ideal source to control mosquito populations.

References

- Boonserm P, Davis P, Ellar DJ, Li, J. Crystal Structure of the Mosquito-larvicidal Toxin Cry4Ba and Its biological implications. *J. Mol. Biol.* 2005; 348:363–382.
- Boonserm P, Mo M, Angsuthanasombat Ch, Lescar J. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Å resolution. *J. Bacteriol.* 2006; 188:3391-3401.
- Bravo A, Gill SS, Soberón M. *Bacillus thuringiensis* Mechanisms and Use with addendum. In *Insect Control*. P 248-281 (Gilbert, L. I., and Gill, S. S.). ELSEVIER. 2010; Elsevier BV ISBN (Set): 978-0-12-381449-4
- Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberón M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol* 2011; 41:423-31.
- Cantón PE, Reyes, EZ, Ruiz de Escudero, I, Bravo A, Soberón M. Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. *Peptides* 2011; 32:595-600.
- Chang C, Yu YM, Dai SM, Law SK, Gill SS. 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* 1993; 59:815-821.
- Chen J, Aimanova KG, Fernandez LE, Bravo A, Soberón M, Gill SS. *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biochem J* 2009a; 424:191-200.

- Chen J, Aimanova KG, Pan S, Gill SS. Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. *Insect Biochem Mol Biol* 2009b; 39:688-696.
- Cohen S, Albeck S, Ben-Dov E, Cahan R, Firer M, Zaritsky A, Dym O. Cyt1Aa toxin: crystal structure reveals implications for its membrane perforating function. *J Mol Biol* 2011; 413:804-814.
- Chow E, Singh GJP, Gill SS. Binding and aggregation of the 24 kDa toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to cell membranes and alteration by monoclonal antibodies and amino acid modifiers. *Appl Environ Microbiol* 1989; 55:2779-2788.
- Crickmore N, Bone EJ, Williams JA, Ellar DJ. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 131:249-254.
- Dechklar M, Tiewisiri K, Angsuthanasombat Ch, Pootankit K. Functional expression in insect cells of glycosylphosphatidylinositol-linked alkaline phosphatase from *Aedes aegypti* larval midgut: a *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptor. *Insect Biochem Mol Biol* 2011; 41:159-166.
- Du J, Knowles BH, Li J, Ellar DJ. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic toxins in association with phospholipid bilayer. *Biochem J* 1999; 338:185-193.
- Fernández LE, AimanovaKG, GillSS, Bravo A, Soberón M. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem J* 2006; 394:77-84.
- Fernández-Luna MT, Lanz-Mendoza H, Gill SS, Bravo A, Soberón M, Miranda-Rios J. An α -amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Environ Microbiol* 2010; 12:746-757.
- Hua G, Zhang R, Abdullah MA, Adang MJ. *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. *Biochem* 2008; 47:5101-5110.
- Jiménez AI, ReyesEZ, Cancino-Rodezno A, Bedoya, LP, Caballero-Flores GG, Muriel-Millan, LF. Likitvivatanavong, S, Gill SS, Bravo A, Soberón, M. *Aedes aegypti* alkaline phosphatase ALP1 is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins. *Insect Biochem Mol Biol* 2012; 42:683-689.
- Likitvivatanavong S, Chen J, Evans AE, Bravo A, Soberón M, Gill SS. Multiple receptors as targets of Cry toxins in mosquitoes. *J Agric Food Chem* 2011; 59:2829-2838.

Wu D, Johnson JJ, Federici BA. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIV proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Mol Microbiol* 1994; 13:965-972.

Zhang Q, Hua G, Bayyareddi K, Adang MJ. Analyses of α -amylase and α -glucosidase in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*, as receptors of Cry11Ba toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. *Insect Biochem Mol Biol* 2013; 43:907-915.