



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Papel de la fosfatasa alcalina ALP1 en el mecanismo de acción de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* en *Aedes aegypti*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biol. Alan Israel Jiménez Reyes

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Mario Soberón Chávez (IBT, UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Susana López Charretón (IBT, UNAM)

Dra. Claudia Martínez Anaya (IBT, UNAM)

MÉXICO, D. F. octubre, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada bajo la asesoría del Dr. Mario Soberón Chávez en el Departamento de Microbiología Molecular, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México con apoyo de la beca 240003 y el proyecto de PAPIIT No. IN205411.

*Dedico este trabajo a mi esposa Karla y a mi hijo Leonardo,
a mis padres Maribel y Juan, a mi hermano Eric,
y a cada una de las personas con las que
disfruté esta etapa de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, particularmente al **Instituto de Biotecnología**, por todo lo que me han brindado como estudiante y como persona, una etapa más de mi vida profesional finaliza con esta tesis para poder continuar con mi formación como científico.

Al **Dr. Mario Soberón Chávez**, por ofrecerme un lugar en su grupo de trabajo y promover día a día mi entusiasmo en la investigación científica como forma de vida. La atención recibida por usted como mi tutor, hizo de mi estadía en el Instituto de Biotecnología una muy grata experiencia. Nunca olvidaré el día en que me recibió con los brazos abiertos en su laboratorio por el simple hecho de ser egresado de la Facultad de Ciencias.

A la **Dra. Alejandra Bravo**, porque sin sus consejos y críticas constructivas, este trabajo no hubiera alcanzado a consolidarse. Su gran pasión por la ciencia y por la generación de ideas innovadoras permitió que mi trabajo alcanzara el éxito esperado.

A la **Dra. Susana López** y la **Dra. Claudia Martínez**, por formar parte de mi comité tutorial y enriquecer con su punto de vista el desarrollo de este trabajo, sus comentarios permitieron que este trabajo fuera definido a lo largo de su elaboración.

Al **Dr. Daniel Segura**, a la **Dra. Claudia Díaz**, al **Dr. Luis Cárdenas**, al **Dr. Humberto Lanz**, miembros del jurado de examen, por todo el tiempo que dedicaron a leer mi tesis, y por darme las correcciones y sugerencias que permitieron mejorar este trabajo.

Al **CONACYT**, por facilitarme una beca que me permitió realizar mis estudios de maestría.

A **Ángeles Cancino**, por guiarme durante el desarrollo de este proyecto, enseñarme las técnicas moleculares y bioquímicas empleadas y ayudarme a mejorar las que sabía hacer previamente. A su manera, me demostró que el trabajo en equipo y el desarrollo de una investigación científica requieren de mucha paciencia y fortaleza.

A **Isabel Gómez**, **Claudia Rodríguez**, **Liliana Pardo**, **Carlos Muñoz** y **Helena Porta**, por sus incontables consejos y asistencias que me ayudaron a superar los diferentes obstáculos que surgieron durante mi trabajo experimental. En especial, a **Isabel Gómez** por apoyarme en los diferentes experimentos que realicé, inclusive dejando un poco de lado las actividades que se encontraba realizando.

A **Lizbeth Cabrera**, **Jorge Sánchez**, **Sergio Blancas** y **Xochitl González**, por el apoyo y consejos técnicos que permitieron que pudiera realizar cada uno de los experimentos realizados durante este proyecto. En especial, a **Liz** por su inigualable atención con los insectos de nuestro laboratorio, y por brindarme su cariño y consejos durante y después de mi estancia en el laboratorio.

A mis amigos y compañeros del laboratorio y del Instituto, **Iván, Leidy, Emiliano, Carol, Israim, Adrián, Yoshi, César, Silvia, Alyeri, Daniel, Ania, Biviana, Esmeralda, Jazmín, Josué, Enrique, Leivi, Violeta, Fernando**, con quienes pasé tantos y tantos momentos gratos e inolvidables. En especial, a **Iván** quien además de ser un gran amigo, se convirtió en un hermano durante todos los años de mi estancia en Cuernavaca, por su apoyo incondicional, tiempo, consejos y muchas veces, brindarme un espacio para alojarme.

A toda mi familia, mis padres **Maribel y Juan**, mi hermano **Eric**, mis abuelos **Emma, Raymundo y María**, y todos mis tíos y primos, por su apoyo incondicional durante toda mi vida, sobre todo en los momentos en que más los necesité. Nunca me han dejado solo a pesar de la distancia.

A mi suegra **Esther**, por preocuparse siempre por el bienestar de mi familia y apoyarnos en todo momento desde que nos conocimos.

Por supuesto, a mi esposa **Karla**, porque encontrarnos y compartir nuestras vidas ha sido lo mejor que me ha pasado. Tu amor, paciencia y perseverancia me mantuvieron con la fortaleza para continuar en el camino sin mirar atrás.

A **Graciela Domínguez**, por brindarme de la mejor manera, la asesoría administrativa que necesité durante mi estancia en el laboratorio.

A la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, por sus servicios y atenciones durante el desarrollo de este proyecto.

A **Antonio Bolaños, Gloria Villa y Jalil Saab** en la unidad de Docencia, por su asistencia en todo momento, y por sus invaluable servicios a la comunidad del IBt.

INDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 Generalidades de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt).....	4
1.2 Clasificación y nomenclatura de proteínas Cry y Cyt.....	5
1.3 Definición de las δ -Endotoxinas Cyt y Cry.....	7
1.3.1 Estructura y modo de acción de las δ -Endotoxinas Cyt.....	7
1.3.2 Estructura de δ -Endotoxinas Cry.....	8
1.4 Modo de acción de las toxinas Cry de tres dominios.....	9
1.4.1 Solubilización y activación proteolítica de las toxinas Cry.....	9
1.4.2 Unión al receptor.....	10
1.4.2.1 Cadherina.....	10
1.4.2.2 Aminopeptidasa N.....	11
1.4.2.3 Fosfatasa alcalina.....	12
1.4.3 Modo de acción de las toxinas Cry1A en <i>Manduca sexta</i>	13
1.4.4 Modo de acción de las toxinas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> subespecie <i>israelensis</i> (Bti) en mosquitos.....	14
1.4.5 Sinergismo entre las toxinas Cry y Cyt.....	15
2. ANTECEDENTES.....	17
2.1 Importancia de <i>Aedes aegypti</i>	17
2.2 Receptores de las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba de Bti en <i>A. aegypti</i>	18
2.2.1 Cadherina como receptor de Cry11Aa en <i>A. aegypti</i>	18
2.2.2 Receptores anclados por GPI: aminopeptidasa N como receptor de Cry11Aa en <i>A. aegypti</i>	19
2.2.3 Fosfatasa alcalina como receptor de Cry11Aa en <i>A. aegypti</i>	20
2.2.4 Receptores de la toxina Cry4Ba en <i>A. aegypti</i>	21
2.3 Uso de RNAi en el silenciamiento de genes en insectos.....	22
3. HIPÓTESIS.....	25
4. OBJETIVOS.....	25
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos particulares.....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1 Medios de cultivo.....	26

5.2 Producción y recuperación de espora-cristal de Cry11Aa, Cry4Ba y Cyt1Aa.....	26
5.3 Diseño de oligonucleótidos específicos de las regiones de interés de fosfatasa alcalina 1 (ALP1).....	28
5.4 Amplificación y purificación de la región dsALP.....	28
5.5 Síntesis de RNA de doble cadena (dsRNA).....	29
5.6 Purificación con fenol-cloroformo del dsRNA.....	31
5.7 Alimentación de larvas de <i>Aedes aegypti</i> con dsRNA.....	32
5.8 Extracción de RNA de larvas alimentadas con dsRNA y RT-PCR semicuantitativo.....	34
5.9 PCR en tiempo real (qPCR).....	35
5.10 Extracción de proteínas totales.....	36
5.11 Cuantificación de proteínas.....	36
5.12 Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	37
5.13 Electroforesis bidimensional (2D-E).....	37
5.14 Inmunodetección de ALP1 por <i>Western-Blot</i>	40
5.15 Bioensayos.....	41
5.16 Análisis estadístico.....	41
6. RESULTADOS.....	43
6.1 Identificación de regiones potenciales para sintetizar dsRNA.....	43
6.2 Clonación de dsALP en <i>pLitmus-28i</i>	43
6.3 Síntesis de dsRNA de la región dsALP.....	44
6.4 Alimentación de larvas de <i>A. aegypti</i> con dsRNA.....	44
6.5 Análisis de la eficiencia del silenciamiento de la ALP en larvas de <i>A. aegypti</i> mediante RT-PCR semicuantitativo.....	45
6.6 Análisis de la eficiencia del silenciamiento de la ALP en larvas de <i>A. aegypti</i> mediante qPCR.....	46
6.7 Análisis del silenciamiento de la ALP mediante <i>Western-blot</i>	47
6.8 Efecto del silenciamiento de ALP en larvas tratadas con toxinas Cry11Aa y Cry4Ba.....	49
6.9 Efecto sinérgico de Cyt1Aa en la actividad de la toxina Cry11 en larvas silenciadas en la expresión de ALP1.....	51
7. DISCUSIÓN.....	53
8. CONCLUSIONES.....	56
9. PERSPECTIVAS.....	57
10. BIBLIOGRAFÍA.....	58
11. ANEXO: Publicación original. “ <i>Aedes aegypti</i> alkaline phosphatase ALP1 is a functional receptor of <i>Bacillus thuringiensis</i> Cry4Ba and Cry11Aa toxins”	63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microfotografía de <i>Bacillus thuringiensis</i> en microscopio electrónico de transmisión.....	5
Figura 2. Relación filogenética de las toxinas Cry de tres dominios.....	6
Figura 3. Estructura tridimensional de la proteína cristal citotóxica Cyt2Aa.....	7
Figura 4. Estructura cristalográfica de la toxina Cry4Aa a 2.8 Å de resolución.....	8
Figura 5. Modo de acción propuesto de las toxinas Cry en Lepidópteros.....	14
Figura 6. Representación de la longitud relativa de las protoxinas Cry y de las posiciones de digestión por proteasas.....	15
Figura 7. Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i>	17
Figura 8. Mecanismo general del RNAi.....	23
Figura 9. Vector <i>Litmus</i> -28i utilizado para la síntesis de dsRNA.....	30
Figura 10. Formación del complejo Effectene-dsRNA.....	33
Figura 11. Producto de PCR del fragmento dsALP de ALP1 en <i>Aedes aegypti</i>	44
Figura 12. dsRNA del fragmento dsALP sintetizado mediante HiScribe RNAi Transcription Kit.....	44
Figura 13. Silenciamiento de ALP1 en larvas de <i>Aedes aegypti</i>	45
Figura 14. Niveles de expresión del mRNA de ALP1 en larvas alimentadas con dsALP comparado con las larvas Control que sólo fueron alimentadas con Effectene.....	46
Figura 15. Expresión relativa de ALP1 en larvas de <i>A. aegypti</i> alimentadas con dsALP.....	47
Figura 16. Análisis del silenciamiento de ALP1 en larvas de <i>A. aegypti</i> mediante <i>Western-blot</i>	48
Figura 17. Detección de ALP1 mediante <i>Western-blot</i> a partir de proteínas aisladas del intestino de larvas control (A) y de larvas alimentadas con dsALP (B), separadas mediante una electroforesis en dos dimensiones (2D-E).....	49

Figura 18. Efecto del silenciamiento de ALP1 en larvas de *A. aegypti* tratadas con la toxinas Cry11Aa o Cry4Ba.....50

Figura 19. El silenciamiento de ALP1 en larvas de *A. aegypti* proporciona un fenotipo tolerante a las toxinas Cry en comparación al grupo control (larvas alimentadas sólo con *Effectene*), y al grupo de larvas alimentadas con dsLacZ.....51

Figura 20. Representación del efecto sinérgico de las toxinas Cyt1Aa y Cry11Aa en larvas de *A. aegypti* con la expresión de ALP1 silenciada.....52

LISTA DE ABREVIATURAS

Bt:	<i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt)
TFP:	toxinas Formadoras de Poro
CAD:	cadherina
APNs:	aminopeptidasas N
GPI:	glicosilfosfatidil inositol
GalNAc:	N-acetilgalactosamina
APN:	aminopeptidasa N
ALP:	fosfatasa alcalina
VMMA:	vesículas de membranas de la microvellosidad apical
CR7-11:	repeticiones de cadherina 7-11
RNAi:	interferencia de RNA
dsRNA:	RNA de doble cadena
dsALP:	RNA de doble cadena de ALP1
mRNA:	RNA mensajero
siRNAs:	RNAs de interferencia cortos
piRNAs:	piwi-interacting RNAs
esiRNAs:	siRNAs endógenos
miRNAs:	microRNAs
RISC:	complejo de silenciamiento inducido por RNA
PMSF:	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PCR:	reacción de Cadena de la Polimerasa
qPCR:	reacción de Cadena de la Polimerasa en tiempo real
DEPC:	pirocarbonatos de dietilo
PVDF:	fluoruro de polivinidileno
IEF:	Isoelectroenfoque
2D-E:	electroforesis en geles de doble dimensión
LC ₅₀ :	concentración letal 50
LC ₁₀ :	concentración letal 10

RESUMEN

La bacteria *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* produce al menos tres toxinas Cry (Cry4Aa, Cry4Ba, and Cry11Aa) que son activas frente a larvas de *Aedes aegypti*. Estos cristales de proteína con función insecticida se unen a receptores de superficie celular en la membrana de la microvellosidad apical del intestino de larvas susceptibles. La interacción toxina-receptor genera poros en las células epiteliales, conduciéndolas a una lisis celular. Debido a su alta especificidad, y a su alta seguridad para los humanos y el ambiente, estas toxinas Cry son consideradas valiosas alternativas a pesticidas químicos en programas de control de insectos.

Trabajos previos en nuestro laboratorio caracterizaron a ALP1 como una molécula de unión a Cry11Aa en el intestino de larvas de *Aedes aegypti*. En el presente trabajo analizamos, usando RNA de interferencia, el papel funcional de la fosfatasa alcalina (ALP1) en la toxicidad de las proteínas Cry11Aa y Cry4Ba. El silenciamiento efectivo de ALP1 fue demostrado por qPCR (PCR en tiempo real) y *Western blot*. Finalmente para observar el efecto fisiológico del silenciamiento de ALP1, las larvas fueron alimentadas con toxinas Cry11Aa o Cry4Ba. Las larvas silenciadas de ALP1 mostraron tolerancia tanto a Cry11Aa como a Cry4Ba. Nuestros resultados muestran que ALP1 es una importante molécula de unión a las toxinas Cry y que está involucrada en la toxicidad de Cry11Aa y Cry4Ba. Sin embargo, muchas otras proteínas ancladas a GPI también participan en el mecanismo de acción de estas toxinas, sugiriendo un complejo mecanismo de acción de estas toxinas con receptores anclados a GPI para ejercer su toxicidad sobre larvas de *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

The bacteria *Bacillus thuringiensis subs. israelensis* produces at least three Cry toxins (Cry4Aa, Cry4Ba, and Cry11Aa) that are active against *Aedes aegypti* larvae. This insecticidal crystal proteins binds to cell surface receptor on the brush border membrane of susceptible midgut larvae. The toxin-receptor interaction generates pores in midgut epithelial cells resulting in cell lysis. Due to their high specificity and their safety to humans and the environment, these Cry toxins are considered to be valuable alternatives to chemical pesticides in insect control programs.

Previous work characterized ALP1 as a Cry11Aa binding molecule from the gut of *Aedes aegypti* larvae. In this work we analyzed the functional role of a GPI-anchored alkaline phosphatase (ALP1) by RNA interference (RNAi) in the toxicity of Cry11Aa and Cry4Ba toxins. Efficient silencing of ALP1 was demonstrated by rtPCR and Western blot. Finally to see the physiological effect of ALP1 knockdown, larvae were fed with Cry11Aa or Cry4Ba toxins. ALP1 silenced larvae showed tolerance to both Cry11Aa and Cry4Ba. Our results show that ALP1 is an important Cry toxin binding molecule that is involved in Cry11Aa and Cry4Ba toxicity. However, several other GPI-anchored proteins also participate in the mode of action of these toxins suggesting a complex binding mechanism of these toxins with GPI-anchored receptors to exert their toxicity to *Aedes aegypti* larvae.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de *Bacillus thuringiensis* (Bt)

La creciente preocupación acerca del uso de insecticidas químicos para el control de insectos peste en agricultura, e insectos vectores de enfermedades humanas importantes, además de una mayor incidencia por el desarrollo de resistencia a insecticidas en los organismos blanco, han provocado que exista un creciente interés en el uso de alternativas biológicas para su control. *Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria Gram-positiva formadora de esporas con propiedades entomopatógenas, y está altamente especializada para resistir a los componentes humorales y celulares del sistema inmune del insecto. Programas de *screening* han demostrado que esta bacteria puede encontrarse en casi cualquier lado, en hábitats que van desde el Ártico hasta los trópicos. Esta ubicuidad ha hecho posible aislar cepas de diversos sitios como del suelo, superficies de plantas, granos almacenados y cadáveres de insectos (De Maagd et al., 2001).

El ciclo de vida de Bt presenta dos fases: la vegetativa y la de esporulación. Durante la fase de esporulación, Bt produce proteínas insecticidas como cristales paraesporales, que componen del 20 al 30% del peso seco de la célula. Estos cristales están compuestos de proteínas conocidas como δ -endotoxinas (figura 1). Las δ -endotoxinas comprenden al menos dos familias multigénicas denominadas Cry y Cyt. Estas proteínas son altamente específicas contra sus insectos blanco, son inocuas para humanos, otros vertebrados y plantas, y son completamente biodegradables. Cada subespecie de Bt codifica para una diferente combinación de toxinas, y esto es lo que le confiere especificidad contra el organismo blanco. Por lo tanto, estas proteínas representan una alternativa viable para el control de plagas en agricultura y vectores de enfermedades de importancia en la salud pública humana (Gómez et al., 2007).

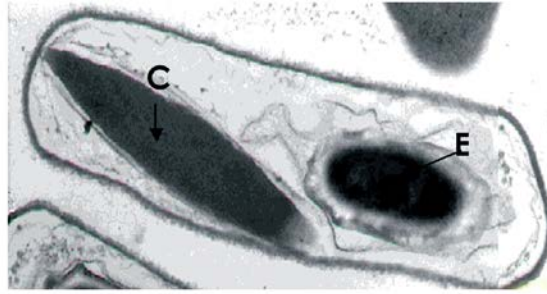


Figura 1. Microfotografía de *Bacillus thuringiensis* en microscopio electrónico de transmisión. Se muestra el cristal proteico romboide compuesto de toxinas Cry y una endoespora. Cristal (C), endoespora (E).

Las toxinas Cry y Cyt de Bt pertenecen a una clase de toxinas bacterianas conocidas como toxinas formadoras de poro (TFP) y existen dos grupos principales: a) toxinas α -hélice y b) toxinas β -barril. El grupo de las toxinas α -hélice forman un poro transmembranal e incluye toxinas como las colicinas, exotoxina A, la toxina de la difteria y las toxinas Cry de tres dominios. Las toxinas β -barril se insertan en la membrana formando un β -barril compuesto de hojas- β *hairpin* en cada monómero. La aerolisina, α -hemolisina, el antígeno protector del ántrax y las toxinas dependientes de colesterol como la perfringolisina y las toxinas Cyt se incluyen en este grupo de toxinas (Parker and Feil, 2005).

1.2 Clasificación y nomenclatura de las toxinas Cry y Cyt.

Una proteína Cry es una proteína de una inclusión cristalina paraesporal de Bt que exhibe algún efecto tóxico contra un organismo blanco, o cualquier proteína que tenga una similitud de secuencia obvia con cualquier proteína Cry conocida (Crickmore et al., 1998). La familia más grande de proteínas Cry es el grupo de toxinas Cry de 3 dominios (3D), y está formado de, al menos, 40 grupos diferentes con más de 200 miembros. Las proteínas Cry presentan actividad insecticida contra diferentes órdenes de insectos (Lepidóptera, Coleóptera, Himenóptera, Díptera) o nemátodos (Bravo et al., 2005).

Por otra parte, Cyt es una proteína de inclusión cristalina paraesporal de Bt que tenga una similitud de secuencia obvia, con cualquier proteína Cyt conocida. Cyt comprende dos familias génicas altamente relacionadas, estas son Cyt1 y Cyt2 (Crickmore et al., 1998).

La nomenclatura de las toxinas Cry y Cyt, está basada en la identidad de la estructura primaria. En primera instancia debe agregársele el prefijo Cry o Cyt, seguido de cuatro

rangos jerárquicos. La figura 2 representa un filograma de las toxinas Cry, en donde las líneas verticales representan los límites en identidad aminoacídica que marcan las diferentes categorías en la nomenclatura. El número arábigo se designa con la primera fila que corresponde hasta 45% de identidad, por ejemplo Cry1, Cry2, Cry11, etc. La segunda fila, cataloga a las proteínas con una letra mayúscula y corresponde a identidades de 45 a 78%, Cry1A, Cry1B, Cry11A, etc. La tercera fila asigna una letra minúscula y corresponde a identidades de 78 a 95%, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry11Aa, etc. La última fila incluye un número arábigo al final de la nomenclatura indicando más del 95% de identidad, Cry1Aa1, Cry1Aa2, etc. (Crickmore et al., 1998, De Maagd et al., 2001).

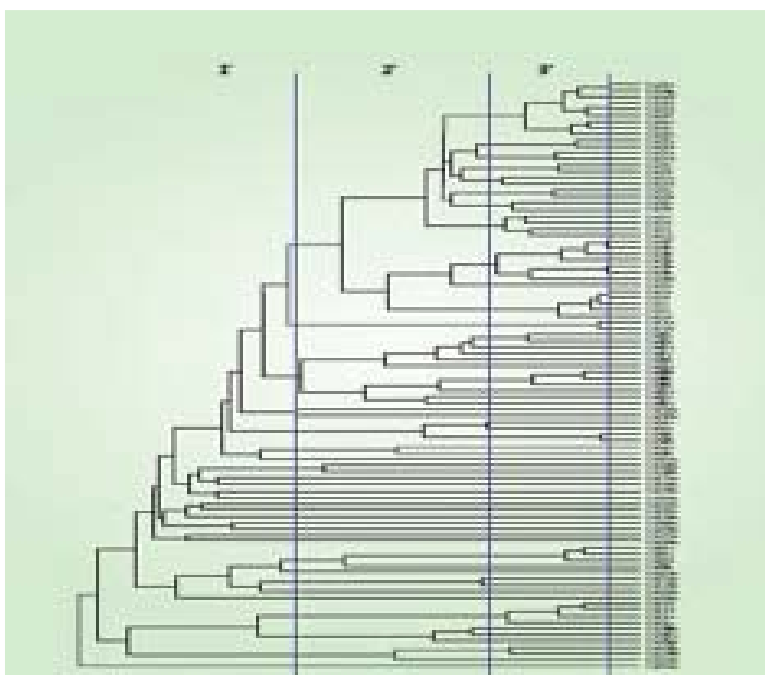


Figura 2. Relación filogenética de las toxinas Cry de tres dominios. Las líneas verticales denotan los cuatro niveles de la nomenclatura. Rango primario con números, rango secundario con letras mayúsculas, rango terciario con letras minúsculas, y cuaternario con números. <http://www.btnomenclature.info/>

Este sistema de nomenclatura se emplea de la misma forma con las toxinas Cyt. En este caso tenemos dos familias génicas altamente relacionadas: Cyt1 y Cyt2 (Crickmore et al., 1998).

1.3 Definición de las δ -Endotoxinas Cyt y Cry

1.3.1 Estructura y modo de acción de las δ -Endotoxinas Cyt

Las endotoxinas Cyt son producidas únicamente por algunas cepas de Bt activas contra insectos dípteros, *in vitro* exhiben una actividad citolítica contra una variedad de células de mamífero e insecto, incluyendo eritrocitos, linfocitos y fibroblastos (Bravo et al., 2005, Soberón et al., 2007). Las proteínas Cyt son moléculas de 25kDa que tienen un dominio sencillo α - β , con dos horquillas (hairpin) de α -hélices externas rodeando una hoja- β . La estructura tridimensional de Cyt2Aa ha sido resuelta y revela los dominios previamente descritos (figura 3). Las asas de unión de estas hojas- β son las responsables de la unión de las toxinas Cyt a las membranas (Li et al., 1996).



Figura 3. Estructura tridimensional de la proteína cristal citotóxica Cyt2Aa.

El mecanismo de acción de estas δ -endotoxinas involucra la solubilización del cristal en el ambiente alcalino del insecto, liberando una protoxina dimérica (Cheong y Gill, 2003), unida por las láminas β del N-terminal. Un procesamiento proteolítico rompe el entrelazamiento de dichas láminas β para liberar a la toxina Cyt como un monómero activo (Li et al., 1996). A diferencia de las toxinas Cry, las toxinas Cyt no unen proteínas localizadas en el intestino del insecto, en su lugar éstas se unen de forma monomérica a los fosfolípidos insaturados de la membrana. La preincubación de las toxinas Cyt con fosfolípidos neutraliza su actividad citolítica e insecticida (Li et al., 1996). Por otro lado, aún se desconoce si estas toxinas forman poros que rompen a la célula, o si ejercen una acción sobre la membrana celular (Soberón et al., 2007).

1.3.2 Estructura de δ -Endotoxinas Cry

La forma activada de las toxinas Cry de 3 dominios (3D) tiene un tamaño aproximado de 60kDa, aunque su correspondiente protoxina puede tener un tamaño de 70kDa o de 130kDa. La extensión C-terminal de las protoxinas grandes es cortada por proteasas presentes en el intestino del insecto durante la activación de la toxina, y se ha propuesto que esta región C-terminal puede jugar un papel relevante en la formación del cristal paraesporal dentro de la bacteria.

Se han resuelto las estructuras tridimensionales de siete diferentes toxinas Cry 3D, éstas son: Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry4Aa, Cry4Ba y Cry8Ea (Li et al., 1991; Grouchulski et al., 1995; Morse et al., 2001; Galitsky et al., 2001; Boonserm et al., 2005, 2006; Guo et al., 2009). A pesar de que estas toxinas presentan diferencias en la especificidad contra sus insectos blanco y niveles de identidad de secuencia de aminoácidos muy bajos, su estructura terciaria se encuentra conservada. Las toxinas Cry 3D son proteínas globulares compuestas por tres dominios funcionales que se representan en la figura 4.

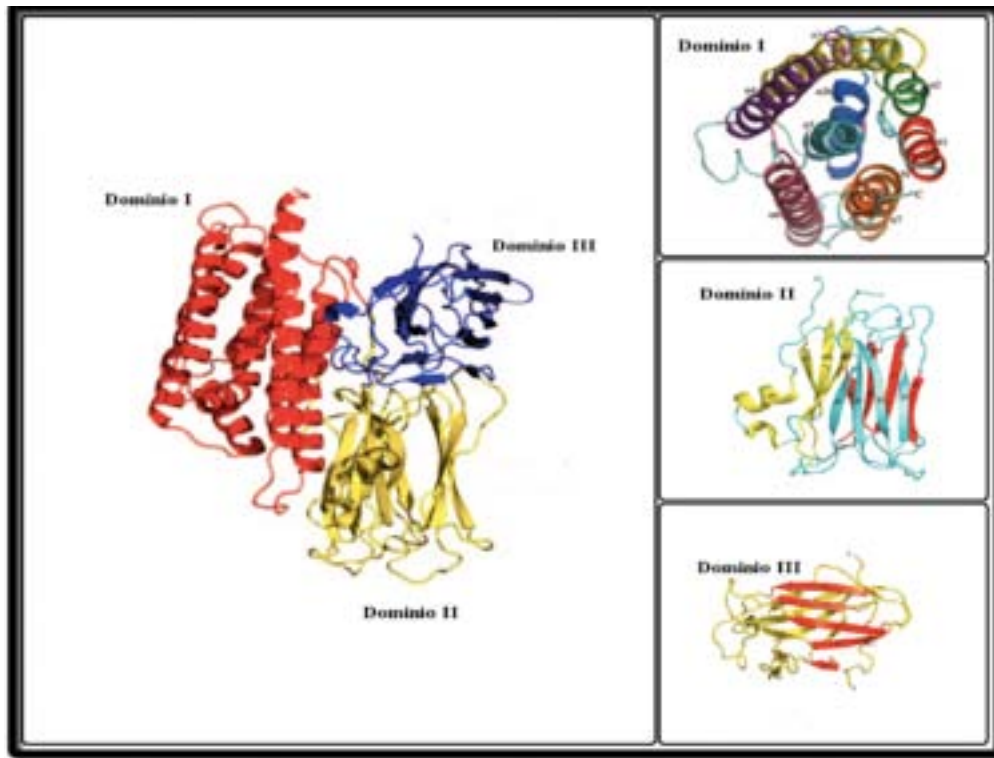


Figura 4. Estructura cristalográfica de la toxina Cry4Aa a 2.8 Å de resolución. Se muestran los tres dominios funcionales que componen a estas proteínas.

El dominio N-terminal (dominio I) es un paquete de siete α -hélices en el cual la α -hélice 5 central es hidrofóbica y está encerrada por las otras 6 hélices anfipáticas; este dominio helicoidal está involucrado en la inserción de la proteína en la membrana. La longitud de la mayoría de las hélices es mayor a 30 Å, lo que sugiere que podrían atravesar a la membrana plasmática (Boonserm et al., 2005).

El dominio II es el responsable de la alta variabilidad que existe entre las toxinas Cry. Consta de tres hojas- β antiparalelas que forman un prisma- β , y de cuatro regiones de tipo asa expuestas (asa1, asa2, asa3 y asa α -8) que varían significativamente en cuanto a su longitud y secuencia de aminoácidos (Boonserm et al., 2005, 2006).

El dominio III está compuesto por dos láminas β antiparalelas formando un β -sándwich con una estructura tipo "jelly roll". Este dominio comparte similitudes estructurales con otras proteínas de unión a carbohidratos, como el dominio de unión a celulosa 1, 4- β -glucanasa C, galactosa oxidasa, sialidasa, β -glucuronidasa, y el dominio de unión a carbohidratos de la xilanasa U y de la β -galactosidasa (de Maagd et al., 2003). Las regiones expuestas en los dominios II y III están involucradas en la interacción con receptores del organismo blanco (Bravo et al., 2005).

1.4 Modo de acción de las toxinas Cry de tres dominios

1.4.1 Solubilización y activación proteolítica de las toxinas Cry

Para que las toxinas Cry de Bt exhiban sus propiedades entomopatógenas, el insecto susceptible debe ingerirlas. Los cristales, al estar expuestos a las condiciones alcalinas y reductoras dentro del intestino de insectos lepidópteros, se disuelven y liberan protoxinas. La solubilización del cristal es un factor determinante para la especificidad de las toxinas Cry; un ejemplo de esto es la toxina Cry1Ba, que es tóxica para insectos coleópteros sólo si la protoxina es previamente solubilizada *in vitro* a un pH alcalino.

Después de la solubilización, las protoxinas Cry son procesadas por proteasas del intestino del insecto, dando como resultado toxinas monoméricas activadas de 60-70kDa (que incluyen los tres dominios descritos anteriormente). Las principales proteasas encontradas en el intestino de insectos lepidópteros y dípteros son del tipo serin-proteasas, mientras que las cisteína- y aspártico-proteasas son abundantes en los intestinos de coleópteros. La activación de las toxinas involucra una remoción proteolítica de 25 a 60 aminoácidos en el extremo N-terminal del péptido, y de aproximadamente 600 residuos del extremo C-terminal; esto en el caso exclusivo de las protoxinas de 130kDa (Soberón et al., 2007).

1.4.2 Unión al receptor

La unión al receptor es el factor clave en la especificidad de las toxinas Cry. Una vez activada la toxina, ésta es capaz de interactuar con proteínas específicas localizadas en la membrana de la microvellosidad apical del intestino de la larva susceptible. Estas proteínas funcionan como receptores para las toxinas Cry, permitiendo que sean altamente selectivas y sólo maten a un tipo limitado de especies de insectos. Los receptores mejor caracterizados son los de insectos lepidópteros, aunque actualmente, el estudio se ha extendido a otros órdenes de insectos, principalmente dípteros. A continuación se muestran las proteínas comúnmente reportadas como receptores de toxinas Cry en insectos.

1.4.2.1 Cadherina

Las cadherinas (CAD) son proteínas con un sólo dominio transmembranal localizadas principalmente entre uniones celulares adherentes. Estas proteínas también pertenecen a un grupo de glicoproteínas transmembranales calcio-dependientes. La presencia de cadherinas en la superficie celular facilita la migración celular, adhesión celular y morfogénesis. La interacción específica de ciertas regiones extracelulares con un ligando puede transferir información al interior de la célula por medio de su interacción con una red compleja de moléculas señalizadoras y del citoesqueleto (Angst et al., 2001).

Las proteínas cadherinas fueron identificadas como proteínas de unión a la toxina Cry1A en *Manduca sexta* (Vadlamudi et al., 1995) y posteriormente, demostraron estar involucradas en la unión y toxicidad en otras especies lepidópteras como *Bombix mori* (Nagamatsu et al., 1998), *Heliothis virescens* (Gahanm et al., 2001), *Helicoverpa armigera* (Xu et al., 2005), *Pectinophora gossypiella* (Morin et al., 2003), *Ostrinia nubilalis* (Flannagan et al., 2005), y más recientemente, en el díptero *Anopheles gambiae* (Chen et al., 2005) y *Aedes aegypti* (Chen et al., 2009a).

1.4.2.2 Aminopeptidasa N

Las aminopeptidasas N (APNs) son proteínas membranales que cortan aminoácidos en el extremo N-terminal de distintos polipéptidos. Comúnmente funcionan, junto con otras enzimas, en la digestión de proteínas derivadas de la dieta del insecto (Wang et al., 2005).

Al ser sintetizadas, las APNs intestinales requieren un péptido señal para dirigir el polipéptido naciente a la superficie externa de la región apical de la membrana citoplásmica, donde la molécula está anclada por un puente GPI (Glicosilfosfatidil inositol). Estas moléculas también pueden sufrir modificaciones post-traduccionales como N- y O-glicosilación, incluyendo la que ocurre por N-acetilgalactosamina (GalNAc), la cual es considerada importante en la interacción entre toxinas Cry1A y APNs (Burton et al., 1999). Sin embargo, se propone que algunas APNs pueden unirse a toxinas Cry de manera independiente del glicano.

Estas proteínas han sido caracterizadas como receptores de toxinas Cry en diferentes especies de insectos. En *Manduca sexta* se observó la unión de las toxinas Cr1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac a una APN de 120KDa. (Masson et al., 1995). Posteriormente se observó la unión de Cry1C a otra APN de 106KDa en el mismo insecto lepidóptero (Luo et al., 1996).

En el caso de *A. aegypti*, se han encontrado tres diferentes APNs involucradas en la toxicidad de Cry4Ba (Saengwiman et al., 2011). Una de éstas APNs (AaeAPN1) había sido caracterizada previamente como receptor de la toxina Cry11Aa en *A. aegypti* (Chen et al., 2009b).

Recientemente, se ha reportado que una mutación deletérea del gene APN en *H. armigera* está asociada con la resistencia a Cry1Ac (Zhang et al., 2009), confirmando que las proteínas APNs juegan un papel importante en la toxicidad de las proteínas Cry.

1.4.2.3 Fosfatasa alcalina

Las fosfatasas alcalinas (ALPs) son metaloenzimas homodiméricas que catalizan, a un pH básico, la hidrólisis o la transfosforilación de monoésteres de fosfato, los cuales son relevantes en el metabolismo energético, regulación metabólica y en algunas rutas de transducción de señales. Estas enzimas homodiméricas, contienen por cada monómero cinco residuos de cisteína y tres iones metálicos, dos Zn^{2+} y un átomo de Mg^{2+} que en conjunto, son esenciales para la actividad de la enzima. Las fosfatasas alcalinas intestinales son capaces de hidrolizar diferentes sustratos, por ejemplo: compuestos con varias cadenas de ácidos grasos, fosfato inorgánico provisto por la dieta del organismo en forma de polifosfatos, y residuos de fosfato de nucleótidos incluyendo adenosina trifosfato. A su vez, estas enzimas son capaces de catalizar la síntesis de difosfatos a partir de fosfato inorgánico, y también pueden transfosforilar tiamina a tiamina monofosfato. Las fosfatasas alcalinas intestinales son glicoproteínas ancladas en la membrana apical mediante un puente GPI (Lallès 2010).

En *M. sexta*, una proteína de 65kDa con actividad de ALP puede unir a la toxina Cry1Ac (McNall et al., 2003). Por otro lado, en *H. virescens* una fosfatasa alcalina de 68KDa interactúa con Cry1Ac. Además, los niveles reducidos de esta ALP en la línea de *H. virescens* YHD2, correlacionan con la resistencia de las larvas a la toxina Cry1Ac (Jurat-Fuentes et al., 2004).

Más tarde, en nuestro laboratorio se identificó y clonó a ALP1 como receptor de las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba en *A. aegypti* (Fernández et al., 2006, 2009).

1.4.3 Modo de acción de las toxinas Cry1A en *Manduca sexta*

El mecanismo de acción de las toxinas Cry ha sido caracterizado principalmente en insectos lepidópteros. Se ha aceptado que la acción primaria de las toxinas Cry es la ruptura de células epiteliales del intestino medio en el organismo blanco por la formación de poros en la membrana apical de las células de la microvellosidad. En nuestro grupo de investigación se ha propuesto el mecanismo de acción que involucra la participación secuencial de por lo menos tres receptores, cadherina, fosfatasa alcalina y aminopeptidasa N (Bravo et al., 2004).

En el caso del lepidóptero *M. sexta*, una vez que las inclusiones cristalinas son ingeridas por las larvas susceptibles, las condiciones alcalinas del intestino promueven su solubilización, liberando a las protoxinas de Cry1A. Después de que estas protoxinas son procesadas proteolíticamente por proteasas presentes en el intestino, la toxina activa se une entonces a un receptor de alta abundancia localizado en la membrana de la célula blanco, identificado como aminopeptidasa N (APN), o fosfatasa alcalina (ALP), ambos anclados por GPI (Glicosilfosfatidil inositol). Esta unión es de baja afinidad. Posteriormente, la toxina se une a un receptor tipo cadherina con una alta afinidad. Es aquí donde se favorece un cambio conformacional en el monómero que permite que la α -hélice 1 sea cortada. Este corte favorece la exposición de regiones hidrofóbicas, lo que induce la formación de un oligómero. Se ha propuesto que la estructura oligomérica está conformada por tres o cuatro subunidades y a este arreglo se le ha considerado la entidad funcional para la formación del poro.

Una vez formado el oligómero, la toxina adquiere mayor afinidad por APN o ALP promoviendo su interacción, esto permite que el oligómero se inserte en las membranas apicales de la microvellosidad celular y forme un poro (figura 5). Subsecuentemente, la ruptura celular y la ruptura del epitelio intestinal libera el contenido celular al haz intestinal, lo cual genera un medio rico en el que las esporas de la bacteria germinan, llevando al insecto a una septicemia y finalmente a la muerte (Bravo et al., 2007).

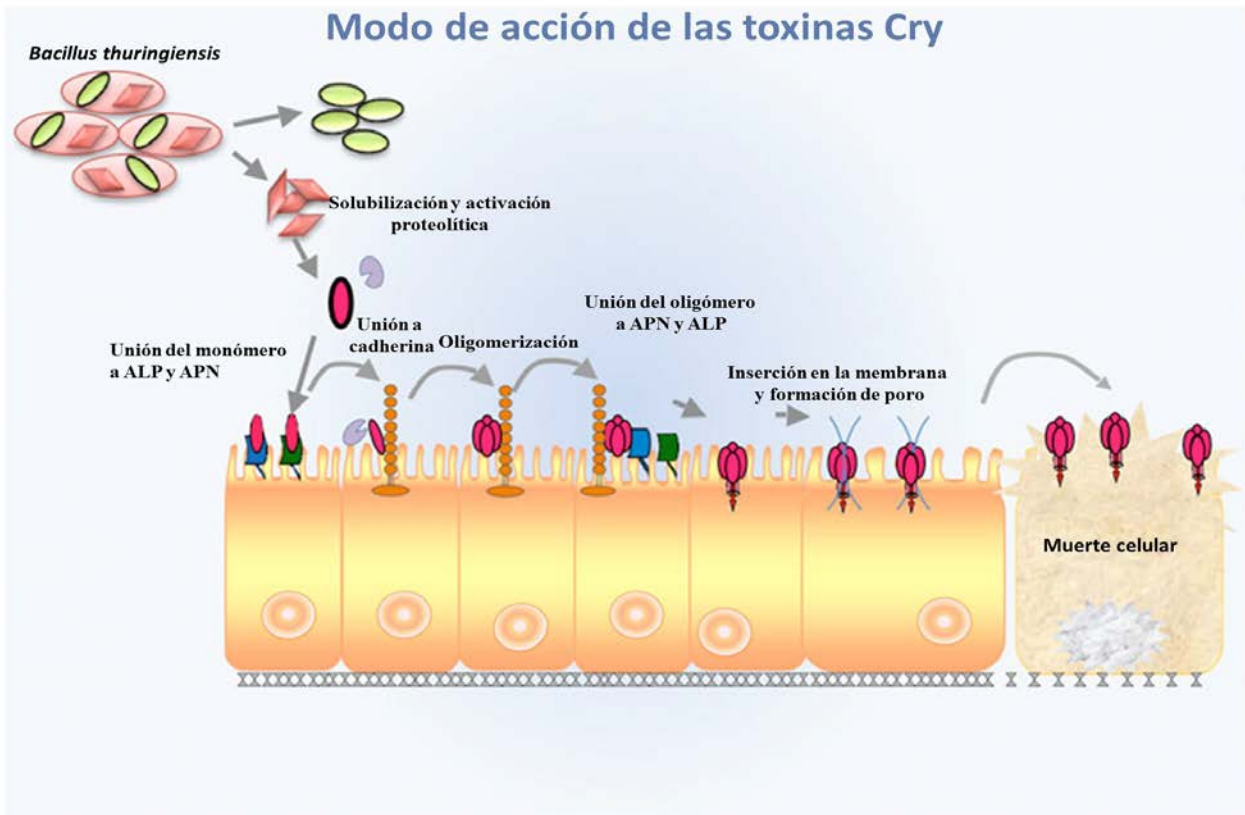


Figura 5. Modo de acción propuesto de las toxinas Cry en Lepidópteros.

1.4.4 Modo de acción de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* (Bti) en mosquitos

Bti es altamente tóxica para diferentes especies de mosquitos de los géneros *Aedes*, *Culex* y *Anopheles*, que son vectores de enfermedades humanas. Esta bacteria produce cristales de inclusión compuestos de toxinas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa y Cyt2Ba (Bravo et al., 2005). Debido a la similitud estructural que existe entre las toxinas Cry4, Cry11 y Cry1, es posible que compartan modos de acción similares (Gómez et al., 2007).

Como sucede en insectos lepidópteros, los cristales de Bti ingeridos por la larva susceptible son solubilizados en el intestino y liberados posteriormente como proteínas solubles. En el caso de la protoxina Cry11Aa de 70kDa, la activación proteolítica, usando extractos de intestino, remueve 28 residuos del N-terminal y hay un corte intramolecular que produce dos fragmentos, uno de 34kDa y otro de 32kDa, los cuales permanecen

asociados y retienen la toxicidad de la proteína. Este también es el caso de la protoxina Cry4Ba de 130kDa, donde cortes en el N-terminal, C-terminal, y cortes intramoleculares resultan en una toxina activa compuesta de dos fragmentos, uno de 18kDa y otro de 46kDa, los cuales permanecen asociados (figura 6) (Soberón et al., 2007).

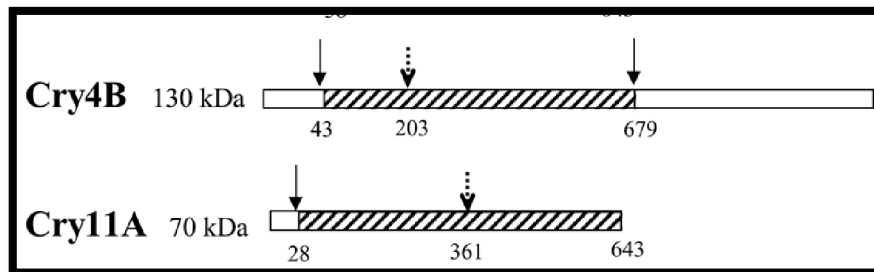


Figura 6. Representación de la longitud relativa de las protoxinas Cry y de las posiciones de digestión por proteasas. Las cajas blancas representan los fragmentos de la protoxinas que son removidos durante la activación y las cajas rayadas representan la toxina activada. Las flechas sólidas representan los sitios de corte N- y C-terminal de las toxinas activadas, las flechas punteadas representan los cortes intramoleculares.

1.4.5 Sinergismo entre las toxinas Cry y Cyt de Bti

La toxicidad de la inclusión cristalina producida por Bti (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, Cyt1Aa), es mucho mayor que la toxicidad de los componentes Cry y Cyt aislados. La toxicidad de diferentes combinaciones de toxinas Cry de Bti con Cyt1A es más grande que la suma de las toxicidades esperadas de los componentes aislados, sugiriendo que la toxina Cyt1A tiene un efecto sinérgico en la toxicidad de las proteínas Cry (Wu et al., 1994). Además, se ha reportado que la toxina Cyt1A supera o suprime la resistencia a las toxinas Cry4A, Cry4B y Cry11A en el mosquito *C. quinquefasciatus* (Wirth et al., 1997). Sin embargo, no ha sido posible seleccionar mosquitos resistentes contra toxinas Cry cuando la selección se realiza en presencia de la toxina Cyt1A (Wirth et al., 1997).

El mecanismo propuesto de sinergismo entre toxinas Cry y Cyt, es que la toxina Cyt1A funciona como un receptor para toxinas Cry. La toxina Cyt1A se inserta en la membrana del intestino y expone las regiones *loop* $\beta 6$ - αE y parte de la $\beta 7$, que son reconocidas por Cry11Aa y Cry4Ba. Las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba se unen a Cyt1Aa a través de las regiones *loop* α -8 y β -4 del dominio II. Estas regiones también están involucradas en la interacción

con sus receptores (Pérez et al., 2005; Cantón et al., 2011). Asimismo, mutaciones puntuales en los epítopes de unión de Cyt1Aa con las proteínas Cry11Aa y Cry4Ba, muestran una correlación entre la unión de Cyt1Aa a estas toxinas y el efecto sinérgico (Pérez et al., 2005; Cantón et al., 2011). Estos resultados sugieren que Cyt1Aa puede funcionar como un receptor para Cry4Ba y Cry11Aa.

En el caso de Cry11Aa, se ha demostrado que la unión de esta proteína con Cyt1Aa promueve la formación de una estructura oligomérica de 250kDa de Cry11Aa, la cual es capaz de formar un poro. Esto sugiere que Cyt1Aa, al menos cumple el papel del receptor cadherina, favoreciendo la formación del oligómero (Pérez et al., 2007).

2. ANTECEDENTES

2.1 Importancia de *Aedes aegypti*

Aedes aegypti es un insecto díptero capaz de transmitir varias enfermedades, entre las que destaca la fiebre amarilla y el dengue. Originario de África, la localización de este vector ha aumentado dramáticamente, principalmente en las zonas tropicales y subtropicales. El ciclo de vida de *A. aegypti* consta de una fase acuática, en la que se desarrollan las etapas de huevo y larva o pupa, y una fase aérea, en su etapa de adulto (figura 7).

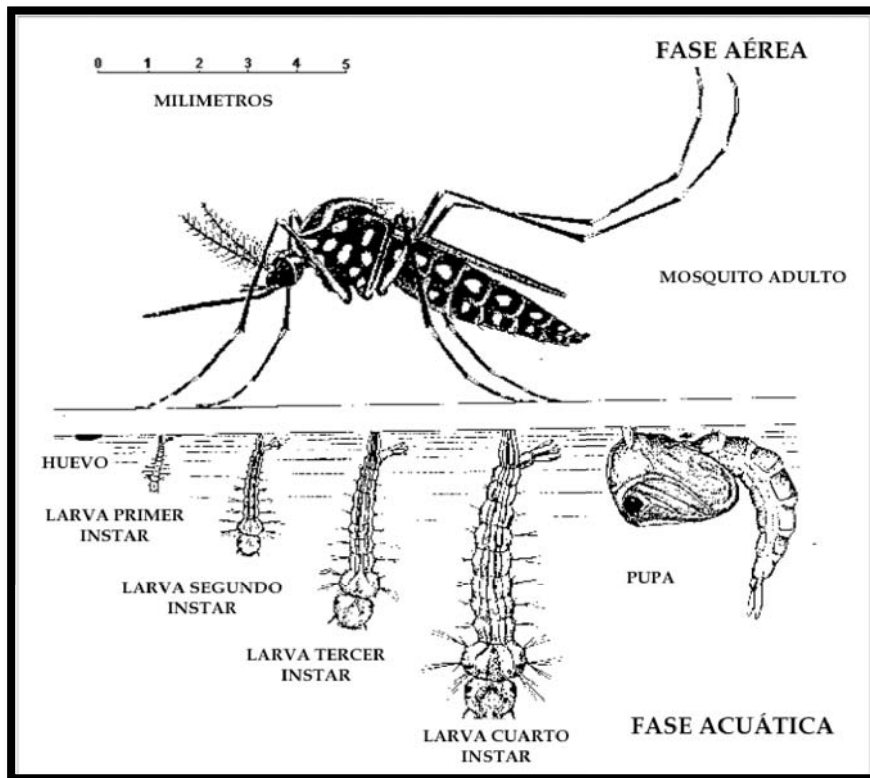


Figura 7. Ciclo de vida de *Aedes aegypti*

El riesgo de contraer alguna de las enfermedades que transmite, particularmente dengue, se ve incrementado, dado que las hembras prefieren alimentarse de sangre humana sobre otro tipo de sangre disponible, pudiendo infectar a varias personas en una vivienda (Harrington et al., 2001). La prevención de la enfermedad producida por el virus del

dengue recae principalmente en el control del vector de transmisión. La manera más eficiente de controlar al mosquito es reducir el número de larvas, para lo cual se usaban anteriormente larvicidas químicos, pero éstos tienen desventajas que aún no han sido superadas, como el incremento en la resistencia desarrollada por el mosquito. Una alternativa viable para el control de este mosquito es el uso de bioinsecticidas como las toxinas producidas por Bti, que son altamente tóxicas y específicas, además de ser completamente biodegradables.

2.2 Receptores de las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba de Bti en *A. aegypti*

De las toxinas producidas por Bti, Cry11Aa y Cry4Ba son las que presentan mayor actividad contra *A. aegypti*. Sin embargo, no se tiene la misma información sobre el mecanismo de acción de las toxinas Cry en dípteros que la que se tiene para lepidópteros. Actualmente, varios grupos de investigación se dedican a estudiar el efecto de las toxinas Cry en insectos dípteros, principalmente tratando de identificar a las proteínas del intestino del insecto que funcionan como receptores de las toxinas Cry, ya que ésta es la base de la especificidad de las toxinas hacia su insecto blanco.

2.2.1 Cadherina como receptor de Cry11Aa en *A. aegypti*

Para las toxinas Cry1A que matan lepidópteros, al menos cuatro receptores distintos en diferentes especies ya han sido caracterizados; CADP (proteína parecida a cadherina), APN y ALP anclados por GPI a la membrana y un glicoconjugado de 270kDa (Bravo et al., 2007). La misma clase de receptores en insectos dípteros ha sido revelada. En el caso de la toxina Cry11Aa estudios previos demostraron que interacciona con una proteína de 250kDa. Tomando en cuenta que esta proteína tenía el mismo tamaño que una cadherina, el grupo del Dr. Sarjeet Gill desarrolló un anticuerpo anti-AaeCad. Este anticuerpo detectó a una proteína de 250kDa en *immunoblots* de vesículas de membranas de la microvellosidad apical (VMMA) de larvas de *A. aegypti*, el anti-AaeCad inhibe la unión de Cry11Aa a VMMA. Además, inmunolocaliza a esta cadherina de 250kDa en las membranas apicales de la caeca distal y proximal, y en las células epiteliales del intestino

posterior. Esta localización es consistente con las áreas a las que la toxina Cry11Aa se une y causa patogenicidad (Chen et al., 2009a). Posteriormente, aislaron el cDNA completo de cadherina de larvas de *A. aegypti*, y de fragmentos que se sobrelapan parcialmente entre sí y cubren a la proteína completa, para expresarlos en *E. coli*. Mediante ensayos de unión a toxina, demostraron que un fragmento de cadherina que contiene CR7-11 (repeticiones de cadherina 7-11), se une a la toxina Cry11Aa y que esta unión molecular se realiza principalmente a través del asa α -8 y 2 del dominio II de la toxina. Esto sugiere que la cadherina de *A. aegypti* es un posible receptor para Cry11Aa, además se encontró una APN y una ALP que también interaccionan con la toxina (Chen et al., 2009a).

2.2.2 Receptores anclados por GPI: aminopeptidasa N como receptor de Cry11Aa en *A. aegypti*

Desde que las APNs fueron identificadas como proteínas de unión a toxinas Cry (Gill et al., 1995), se ha reportado que al menos una aminopeptidasa N puede unir toxinas Cry11Aa. Mediante ensayos de *pull-down*, utilizando la toxina Cry11Aa biotinilada y VMMAAs de *A. aegypti* solubilizadas, se encontraron tres proteínas que al eluirse fueron identificadas como aminopeptidasas N. Una de éstas era de 140kDa, nombrada AaeAPN1 e inmunolocalizada con un anticuerpo anti-AaeAPN1 en el lado apical de las células epiteliales del intestino posterior de la larva. El gen AaeAPN1 completo fue expresado en células Sf21. El producto, aunque enzimáticamente activo con un puente de GPI anclado a la membrana, interesantemente, no unía a Cry11Aa. Se cree que la interacción de las toxinas Cry con APNs generalmente involucra motivos glicosilados. Por ejemplo, N-acetilgalactosamina (GalNAc) es un importante determinante de la interacción de Cry1Ac con la APN de 120kDa de *Manduca sexta* (Burton et al., 1999). Una posible razón para explicar este fenómeno, puede ser que una glicosilación inapropiada enmascare al sitio de unión independiente del glucano. La caracterización de la unión de la toxina Cry11Aa a AaeAPN1 permanece aún bajo investigación (Chen et al., 2009b).

2.2.3 Fosfatasa alcalina como receptor de Cry11Aa en *A. aegypti*

En *A. aegypti*, nuestro grupo caracterizó una ALP de 65kDa que se une a Cry11Aa y Cry4Ba. Mediante experimentos de unión a ligando se determinó que existen dos proteínas ancladas por GPI a la membrana, una de 65kDa y otra de 100kDa que se unen a la toxina Cry11Aa. El análisis de cromatografía por afinidad mostró que la toxina en su conformación nativa se une a la proteína de 65kDa. Para determinar si esta proteína de 65kDa era una APN o una ALP, la actividad específica de esa proteína fue determinada, y sólo se encontró actividad de ALP en el eluyente. Posteriormente, se aisló un fago péptido (P1.BBMV) utilizando la metodología de despliegue en fagos que reconoce a esta ALP, afectando tanto la unión de la toxina Cry11Aa a las VMMA, así como su toxicidad. Al inmunolocalizar a la ALP utilizando el fago péptido P1.BBMV, se observó que esta proteína se localiza en la parte posterior del intestino y en la caeca, en las mismas regiones de unión de Cry11Aa en el intestino de *A. aegypti*. Al competir la unión del fago péptido P1.BBMV a la toxina Cry11Aa, utilizando los péptidos sintéticos de las regiones expuestas de la toxina Cry11Aa descritos en trabajos previos (Fernández et al., 2005), se observó que solo el péptido sintético del asa α -8 inhibe la unión de P1.BBMV a las VMMA, lo que sugiere que se unen al mismo sitio y corrobora la importancia del asa α -8 de la toxina Cry11Aa en la unión al receptor (Fernández et al., 2006).

Más tarde, también en nuestro laboratorio, se clonó y caracterizó funcionalmente a este receptor ALP-Cry11Aa de *A. aegypti*. Se identificaron 3 transcritos de ALP en el intestino de larvas de *A. aegypti*, las tres clonas de cDNA obtenidas se expresaron en *E. coli* y se demostró que la isoforma recombinante ALP1 obtenida se une a Cry11Aa, Cry4Ba y al fago péptido P1.BBMV que se une específicamente al receptor ALP-Cry11Aa en el intestino. Un anticuerpo anti-ALP1 inhibió la unión a las VMMA, así como su toxicidad en cultivos de intestinos aislados. Después, dos regiones de unión de Cry11Aa con ALP1 (R59-G102 y N257-I296) fueron mapeadas mediante la caracterización de la unión de Cry11Aa a nueve péptidos recombinantes sobrelapados que cubren la secuencia completa de ALP1. Finalmente, utilizando un *peptide spot array* del dominio III de Cry11Aa y mutagénesis

sitio-dirigida, se demostró que la región R59-G102 de ALP1 se une a Cry11Aa a través del asa α -8 del dominio II, mientras que la región N257-I296 de ALP1 interactúa con Cry11Aa a través de la región ⁵⁶¹RVQSQNSGNN⁵⁷⁰ del dominio III localizada en β 18- β 19. De esta forma, se demostró que los dominios II y III de Cry11Aa están involucrados en la unión, por dos sitios distintos, al receptor ALP1 (Fernández et al., 2009).

2.2.4 Receptores de la toxina Cry4Ba en *A. aegypti*

Recientemente se han identificado 3 aminopeptidasas-N ancladas por GPI que actúan como receptores de Cry4Ba. Estas tres isoformas se expresan funcionalmente en el intestino de *Aedes* y el silenciamiento específico de cada una de estas isoformas individualmente mediante dsRNA le confiere a las larvas de mosquito un fenotipo tolerante a la toxina Cry4Ba. Interesantemente, una de las isoformas de APN identificadas en este estudio es la AaeAPN1 que fue caracterizada como receptor de la toxina Cry11Aa en el grupo del Dr. Sarjeet Gill, sugiriendo que las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba pueden emplear algunas isoformas de APN ancladas por GPI como receptores para ambas toxinas. Sin embargo, el silenciamiento de una isoforma particular de APN (APN2783) le confiere un fenotipo tolerante a la toxina Cry4Ba más fuerte que el silenciamiento de cualquiera de las otras dos isoformas. Estos resultados revelan que las tres isoformas de APN ancladas por GPI expresadas en el intestino de las larvas de *Aedes* pueden funcionar como un receptor funcional para la toxina Cry4Ba (Saengwiman et al., 2011).

Finalmente, además de la ALP1 que puede ser reconocida por Cry4Ba y que fue identificada en trabajos previos de nuestro laboratorio, el grupo del Dr. Pootanakit ha logrado clonar y expresar a una nueva isoforma de ALP de 58.7kDa (mALP) anclada por GPI a la membrana plasmática en una línea celular de insecto Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). Esta nueva isoforma de ALP anclada por GPI sólo comparte el 39% de identidad con la ALP1, el receptor reportado para Cry11Aa en *A. aegypti*. Una vez que se expresó mALP en la línea celular Sf9, se logró observar que la toxina Cry4Ba era capaz de reconocer sólo a las células que expresan mALP y que se inmunolocaliza en la superficie de la membrana

plasmática. Posteriormente, para determinar si mALP puede funcionar como un receptor para esta toxina, Cry4Ba activada fue utilizada para realizar ensayos de toxicidad. Sólo las células que expresaron mALP mostraron susceptibilidad a la toxina Cry4Ba (Dechklar et al., 2011).

Estos datos sugieren que, además de las tres aminopeptidasas N ancladas por GPI a la membrana plasmática, existen por los menos dos ALP, también ancladas por GPI, que pueden funcionar como receptores de la toxina Cry4Ba durante el mecanismo de acción en *A. aegypti*.

2.3 Uso de RNAi en el silenciamiento de genes en insectos

El silenciamiento de genes específicos a través de la interferencia de RNA (RNAi) ha revolucionado el estudio de la función de los genes de cualquier organismo. Muchos organismos eucarióticos, incluyendo insectos, poseen una maquinaria común para el silenciamiento post-transcripcional de genes con base en una secuencia específica que es activada por la presencia de RNA de doble cadena (dsRNA), resultando en la degradación del RNA mensajero (mRNA) blanco (Fire et al., 1998). Este proceso depende del apareamiento específico Watson-Crick formado por el RNA pequeño y su mRNA blanco que activa el silenciamiento génico. Diferentes tipos de RNAs pequeños han sido descritos en insectos y otros organismos multicelulares incluyendo RNAs de interferencia cortos (siRNAs), piwi-interacting RNAs (piRNAs), siRNAs endógenos (esiRNAs) y microRNAs (miRNAs) (Siomi and Siomi, 2009).

El proceso básico de RNAi puede ser dividido en tres pasos principales (figura 8) (Tomari and Zamore, 2005). Primero, una molécula larga exógena o endógena de dsRNA, que es expresada en la célula o introducida en ella, es procesada por Dicer en pequeños RNAs de doble cadena de 21-22 nucleótidos. Dicer es una enzima ribonucleasa III (RNasa III). Dependiendo del organismo, puede haber una o más enzimas Dicer, cada una responsable de producir un diferente tipo de dsRNA pequeño. Por ejemplo, en *Drosophila*

melanogaster, Dicer-1 es usada principalmente para producir miRNAs, mientras que Dicer-2 es responsable de la generación de pequeños siRNAs mediante el procesamiento de dsRNAs largos (Lee et al., 2004). Durante el segundo paso del mecanismo de RNAi, estos dúplex de RNA son desapareados y una de las cadenas sencillas (ssRNA) llamada cadena guía, entra en un complejo protéico, conocido como el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Finalmente, el complejo RISC encuentra el mRNA blanco potencial basándose en la complementariedad entre el mRNA y el siRNA. Es entonces cuando la endonucleasa asociada a RISC, una proteína Argonauta, corta a la molécula blanco, un RNA mensajero (figura 8). En general, el descubrimiento de que las células responden al dsRNA silenciando al gen blanco, nos ha proveído de una herramienta poderosa para estudiar la regulación y función génica.

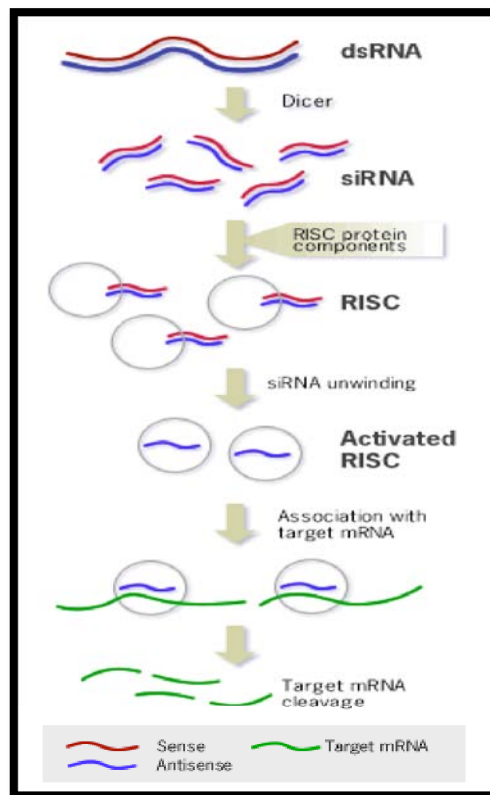


Figura 8. Mecanismo general del RNAi

El dsRNA puede ser introducido al organismo por diferentes vías, donde la inyección de dsRNA sintetizado *in vitro* o el alimentar al organismo con RNA de doble cadena, son las

vías de entrega más utilizadas, esta última forma además no es invasiva. Recientemente, en nuestro laboratorio se ha logrado optimizar el silenciamiento de genes en *A. aegypti* alimentando larvas con dsRNA asociado al agente lipídico *Effectene* (dsRNA-*Effectene*). Utilizando esta forma de RNAi en *Aedes*, se demostró que el silenciamiento de la proteína MAPK p38 provoca hipersensibilidad a Cry11Aa (Cancino-Rodezno et al., 2010). Esto muestra que es posible potenciar la acción de las toxinas insecticidas Cry inhibiendo una vía de transducción de señales específica, además de que se pueden silenciar genes en larvas de *A. aegypti* utilizando el agente lipídico *Effectene* como vehículo para la administración de dsRNA.

De esta manera, con la finalidad de tener un mejor entendimiento acerca del papel de la fosfatasa alcalina 1 (ALP1) *in vivo* en el mecanismo de acción de las toxinas Cry en *A. aegypti*, hemos decidido recurrir al silenciamiento de ALP1 alimentando larvas de mosquito con dsRNA-*Effectene*. Así, podremos observar cómo se afecta la toxicidad de las proteínas Cry11Aa y Cry4Ba con la ausencia del receptor ALP1 en *Aedes*.

3. HIPÓTESIS

ALP1 es el receptor funcional de las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba en *Aedes aegypti*, por lo que este organismo adquirirá resistencia a estas toxinas cuando no esté presente el receptor en el intestino.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la toxicidad de las proteínas Cry11Aa y Cry4Ba en larvas de *A. aegypti* silenciadas en la expresión de ALP1.

4.2 Objetivos particulares

- I. Analizar las regiones del gen de ALP1 e identificar alguna que permita silenciar el transcrito mediante dsRNA sintetizado *in vitro*
- II. Determinar las condiciones para realizar el silenciamiento de ALP1 utilizando dsRNA en larvas de *A. aegypti*
- III. Realizar bioensayos utilizando a la toxina Cry11Aa y Cry4Ba con larvas silenciadas en la expresión de ALP1

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Medios de cultivo

Nombre	Componentes	Especificaciones
Medio SP	Caldo nutritivo 8g MgSO ₄ 0.25g KCl 1g Bacto-agar 20g	Aforar a 1 litro con agua destilada y se ajusta el pH a 7 con KOH. En caso de requerirse sólido se agrega el agar al final. Se esteriliza. Una vez esterilizado y enfriado, se agrega el antibiótico (eritromicina 10 ó 25µg/ml) y las soluciones S1 (1ml), S2 (2ml) y S3 (1ml).
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 se ajusta el pH a 7 con NaOH. En caso de requerirse sólido se agrega el agar al final. Se esteriliza. Una vez esterilizado, se agrega el antibiótico (ampicilina 100µg/ml).
Soluciones	Componentes	Especificaciones
Solución 1 (S1)	MnCl ₂ ·4H ₂ O 0.198g/100ml	Se disuelven 0.198g en 100ml de agua destilada. Se esteriliza por filtración.
Solución 2 (S2)	FeSO ₄ ·7H ₂ O 9.15g/250ml H ₂ SO ₄ 7ml/250ml	Se disuelven 9.15g de FeSO ₄ ·7H ₂ O en 250ml de agua destilada y se le agregan 7ml de H ₂ SO ₄ 1N. Se esteriliza por filtración.
Solución 3 (S3)	CaCl ₂ ·2H ₂ O 9.8g/100ml	Se disuelven 9.8g en 100ml de agua destilada. Se esteriliza por filtración.

5.2 Producción y recuperación de espora-cristal de Cry11Aa, Cry4Ba y Cyt1Aa

La cepa Bti resistente a eritromicina que contiene el plásmido pCG6-Cry11Aa, se cultivó por el método de estrías sobre la totalidad de la superficie de una caja de medio sólido de esporulación SP, con 25µg/ml de eritromicina y se incubó a 30°C. La cepa se reactivó realizando 2 pases sucesivos (24 horas cada uno) en mismo medio con antibiótico con el objetivo de favorecer la esporulación y producción de inclusiones cristalinas. Finalmente, se sembraron 20 cajas en medio SP con eritromicina (25µg/ml) y se incubaron por dos días a 30°C.

Posteriormente, la producción de cristales se verificó por microscopía óptica una vez que transcurrieron los dos días de incubación. Para esto, se colocaron 20µl de agua destilada estéril sobre un portaobjetos, se emulsificó en el agua una asada del cultivo previamente

descrito y se colocó un cubreobjetos. Esta preparación se observó en el microscopio óptico, y a través de un contraste de fases se detectaron las esporas y cristales de toxinas bacterianas y la ausencia de células vegetativas.

El contenido celular de las cajas cultivadas se transfirió con asa a un tubo falcon de 50ml con 20ml de agua destilada estéril con PMSF 1nM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) como inhibidor de proteasas. Posteriormente, se realizó la homogenización en frío, para ello se sonicó la muestra mediante 3 pulsos de 30 segundos a 20 watts en hielo; se alternó cada pulso con 1 minuto de reposo en hielo. La muestra homogenizada por sonicación se centrifugó 15 minutos a 12000 rpm a 4°C. La pastilla se recuperó y resuspendió en 20ml agua destilada estéril con PMSF 1nM. Después, la muestra se centrifugó 15 minutos a 12000 rpm a 4°C y se repitió el procedimiento de recuperación y resuspensión en agua destilada estéril con PMSF 1nM dos veces más. La muestra de cristales de la toxina Cry11Aa se resuspendió en agua estéril con PMSF 1nM y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Los cristales de las toxinas de Cry4Ba y Cyt1Aa se produjeron mediante un protocolo similar pero utilizando la cepa de Bti que contiene el plásmido pHT618-Cry4Ba o el plásmido pWF45-Cyt1Aa, respectivamente; y las cajas con medio de cultivo SP se complementaron con 10µg/ml de eritromicina.

Las toxinas producidas se cuantificaron por el método de Bradford y se analizó la integridad y peso molecular de éstas a través de su separación en una electroforesis desnaturizante, en un gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) para Cry11Aa y Cyt1Aa, y en un gel de poliacrilamida al 10% para Cry4Ba. Las muestras se procesaron de la siguiente forma:

A 10µg de toxina se le agregaron 5µl de solución lítica 4X, se hirvió la muestra durante 5 minutos, y se realizó la electroforesis en gel SDS-PAGE durante 1 hora a 24mA. Posteriormente, el gel se lavó con agua destilada y se tiñó con una solución de azul de Commasie (BioRad) en agitación por una hora.

5.3 Diseño de oligonucleótidos específicos de las regiones de interés de fosfatasa alcalina 1 (ALP1)

Los oligonucleótidos usados para amplificar los fragmentos seleccionados de ALP1 se diseñaron sobre la secuencia reportada en la base de datos para *A. aegypti*, usando el software libre Oligo4 para diseñar oligonucleótidos sin estructuras secundarias. Al sintetizar a los oligonucleótidos destinados a amplificar el fragmento dsALP, se incluyeron las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción EcoRI y HindIII en los extremos, lo cual facilitó la posterior clonación del fragmento amplificado en el vector *pLitmus-28i*. También se diseñaron un par de oligonucleótidos para amplificar una región única de 374pb del gen ALP1 (ALP1) y un par de oligonucleótidos para amplificar una región del gen α -tubulina (AAEL006179) como control interno, que fueron utilizados para verificar por medio de RT-PCR la presencia o ausencia del transcrito después del tratamiento experimental. Se diseñó una pareja más de oligonucleótidos para amplificar un fragmento de 120pb del gen ALP1 (qALP) y una pareja de oligonucleótidos para amplificar un fragmento del gen de la proteína ribosomal RPS3 (control interno), para analizar el transcrito de ALP1 por PCR en tiempo real.

A continuación se muestran las secuencias de los oligonucleótidos diseñados.

Región	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño del segmento amplificado por PCR (pares de bases)
dsALP	5'- GAT CGA ATT CTA AGA ATG GTT GTT CAA TCG - 3'	149
	5'- GAT CGA ATT CGT TAT AAA TTA CAA ATT TAT TGA - 3'	
ALP1	5'- CCG GAA TTC GTG ACG ACG GGA ATC TGA AC - 3'	374
	5'- CCC AAG CTT GAC ATG GTT CTT GGG GTC AT - 3'	
qALP	5'- CGA TCT CAC TTA CGC CGC TA - 3'	120
	5'- TCC AGG GAT TTC CGA GCT TT - 3'	
Tubulina	5'- CTA CGG CAA GAA GTC CAA AGC - 3'	250
	5'- GAA GCG TGA TCG AAG AGAC - 3'	
RPS3	5'- GGC ATG TTC CGT GCT GAA TTG AACG - 3'	230
	5'- TTC TCG GCG TAC AGC TCG ACG - 3'	

5.4 Amplificación y purificación de la región dsALP

Utilizando los oligonucleótidos diseñados para la región dsALP de fosfatasa alcalina 1 de *Aedes*, se amplificó el fragmento deseado mediante PCR (Reacción en Cadena de la

Polimerasa), utilizando como templado el DNA plasmídico extraído de la clona de ALP1 recombinante que tenemos en el laboratorio. Para esta reacción se mezclaron 5µl de MgCl₂ (50mM), 5µl de Buffer Taq 10X (200mM Tris-HCl, pH 8.4; 500mM KCl, Invitrogen), 1µl de dNTPs 10mM (Invitrogen), 1µl de DNA, 1µl de Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 1 µl de cada oligonucleótido (10µM) correspondientes al fragmento dsALP; la reacción se aforó a 50µl con agua destilada estéril. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

- 1.- Un primer ciclo de 95°C por 5 minutos
- 2.- 32 ciclos de 95°C por 30 segundos para desnaturalización, 60°C por 30 segundos para la hibridación de los oligonucleótidos y 72°C por 45 segundos para la elongación de la cadena.
- 3.- Un último ciclo de elongación de 5 minutos a 72°C

Se verificó la integridad del producto, así como su peso mediante su separación por electroforesis en un gel de agarosa ultra pura al 2%. El producto de PCR se purificó con *MinElute PCR Purification Kit* (Qiagen) utilizando columnas de membrana de sílica siguiendo el protocolo del fabricante, y se envió a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM para verificar su secuencia.

5.5 Síntesis de RNA de doble cadena (dsRNA)

El vector seleccionado para realizar la clonación del producto de PCR fue el plásmido *Litmus 28i* (Invitrogen) (figura 9). Este vector posee dos promotores para la enzima RNA polimerasa T7 situados de forma opuesta e incluye al gen de resistencia ampicilina, lo que permite la transcripción *in vitro* de dos cadenas de RNA complementarias que se asocian formando una doble cadena de RNA (dsRNA). Este dsRNA se utilizó para realizar el silenciamiento post-transcripcional del gen de interés, ALP1.

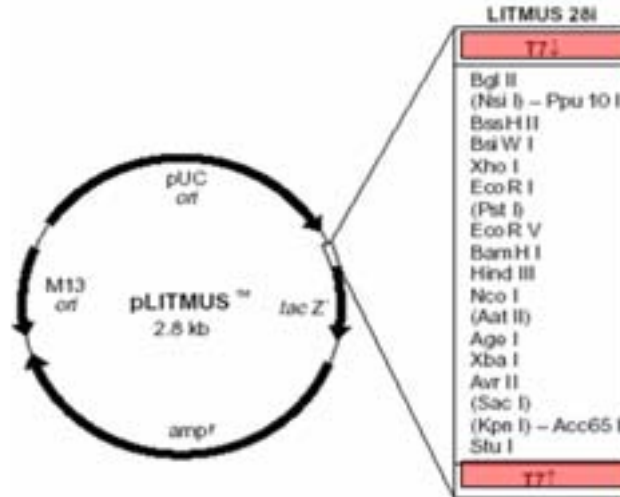


Figura 9. Vector *Litmus-28i* utilizado para la síntesis de dsRNA

El producto del PCR de la región dsALP se clonó en el vector pLitmus-28i utilizando los sitios de restricción HindIII y EcoRI que contienen tanto el fragmento de interés como el plásmido. Mediante electroporación, células de *Escherichia coli XL1-Blue* se transformaron genéticamente con la construcción hecha con el fragmento de interés. Las colonias de *E. coli XL1-blue* transformadas fueron seleccionadas por su resistencia a ampicilina, para ello se sembraron en placas con medio sólido LB suplementado con ampicilina (100µg/ml) esparciéndolas con perlas de vidrio y dejándolas a 37°C durante 24 horas. Las colonias seleccionadas por su resistencia a ampicilina se subcultivaron en medio líquido LB suplementado con ampicilina (100µg/ml) a 37°C durante 12 horas. Posteriormente, se purificó el DNA plasmídico utilizando el *kit Miniprep QIAprep* (Qiagen). Este procedimiento se basa en la lisis alcalina de las células bacterianas seguido de una absorción del DNA en una membrana de sílica en presencia de altas concentraciones de sal. Finalmente, la muestra de DNA se envió a la Unidad de Secuenciación del IBt-UNAM para corroborar que la secuencia insertada fuera la deseada.

Utilizando este DNA plasmídico como templado, se realizó una PCR utilizando el oligonucleótido T7 (Invitrogen) siguiendo las condiciones de reacción descritas en la sección 5.4, pero utilizando 51°C como temperatura de hibridación del oligonucleótido T7,

de acuerdo al protocolo del fabricante (Invitrogen). Posteriormente, el nuevo producto de PCR se purificó con *MinElute PCR Purification Kit* (Qiagen). Utilizando 1µg de este DNA por reacción, se realizó la transcripción *in vitro* utilizando el *HiScribe T7 In vitro Transcription Kit* (New England BioLabs, Inc.). Éste es un sistema para la síntesis *in vitro* de grandes cantidades de dsRNA o ssRNA utilizando a la RNA polimerasa T7 que reconoce a las secuencias promotoras T7 del templado. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: a un 1µg de DNA purificado se le agregaron 4µl de buffer de transcripción 10X(400nM Tris-HCl, pH 8; 190nM MgCl₂; 50mM DTT; 10mM spermidine), 2µl de la mezcla de ribonucleótidos 20X (20mM Tris-HCl, pH 7.8; 10mM DTT; 80mM de cada ribonucleótido), 2µl de HMW mix 20X (High Molecular Weight mix; 20nM Tris-HCl, pH 8; 83 units/ml inorganic pyrophosphase (yeast); 20000 units/ml murine ribonuclease inhibitor; 40% glycerol) y 4µl de RNA polimerasa T7. Esta mezcla se aforó a 40µl con agua libre de RNAsas y se incubó a 42°C entre 4-8 horas. Se realizaron las reacciones necesarias hasta tener la cantidad deseada de dsRNA. El dsRNA resultante de la transcripción *in vitro* se purificó mediante una precipitación con fenol-cloroformo, como se sugiere en el manual del producto.

5.6 Purificación con fenol-cloroformo del dsRNA

Por cada 20µl de reacción de transcripción *in vitro* se agregaron 120µl de agua tratada con 0.1% de pirocarbonatos de dietilo (DEPC) y 15µl de acetato de sodio 3M pH 5.2. El dsRNA se extrajo con un volumen igual de una mezcla 1:1 de fenol-cloroformo y la mezcla se centrifugó por 2 minutos a 13000 rpm, se removió la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo. A continuación, se le agregó un volumen igual de cloroformo y se mezclaron bien las dos fases por agitación usando un vórtex, se centrifugó la mezcla durante 2 minutos a 13000 rpm y se removió la fase acuosa transfiriéndola a un tubo nuevo. Este paso se repitió una vez más. El dsRNA se precipitó agregando dos volúmenes iguales de etanol absoluto y se mantuvo a -20°C por lo menos 30 minutos. Para recuperar el dsRNA se centrifugó a 4°C 14000 rpm por 15 minutos, se removió el sobrenadante y se secó en

savant durante 15 minutos. La pastilla de dsRNA obtenida se resuspendió en 20µl de agua tratada con DEPC.

Se verificó la integridad y el peso del dsRNA producido mediante una separación del fragmento por electroforesis en un gel de agarosa ultra pura al 2%. El dsRNA se cuantificó usando el *NanoDrop 2000* (ThermoScientific) midiendo la absorbancia a 260nm. Para calcular la concentración de dsRNA en las muestras, se utilizó la fórmula: 1 densidad óptica (O.D.) a 260 nm= 40µg/ml de dsRNA, de acuerdo a la recomendación del fabricante (HiScribe T7 *In vitro* Transcription kit Instruction manual, New England BioLabs, Inc.). Se determinó la pureza de la muestra al determinar el cociente 260/280nm, utilizando sólo las muestras cuyo cociente fuera mayor a 1.8.

5.7 Alimentación de larvas de *A. aegypti* con dsRNA

El *Effectene Transfection Reagent Kit* (Qiagen) se utilizó para administrar el dsRNA a larvas recién eclosionadas de *A. aegypti*. De manera breve, las moléculas de dsRNA se condensaron por la interacción con el *Enhancer* (Qiagen) en un buffer de condensación (buffer EC, Qiagen). Después, se agregó a la mezcla el agente lipídico *Effectene* para producir un complejo condensado de *Effectene*-dsRNA. El *Effectene* espontáneamente forma micelas que no muestran variación en tamaño (figura 10). De esta forma se administró 1µg de dsRNA por larva neonata de *A. aegypti* de acuerdo a la siguiente descripción.

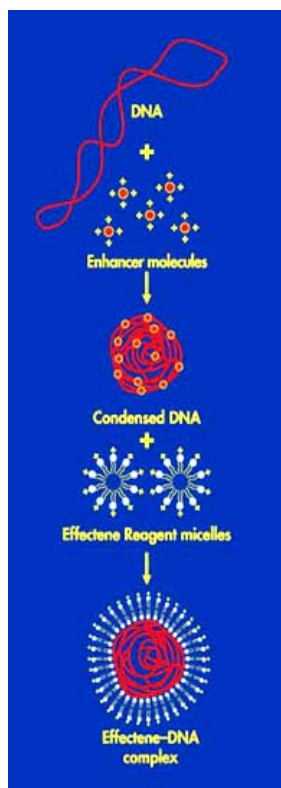


Figura 10. Formación del complejo *Effectene*-dsRNA.

200 larvas recién eclosionadas de *A. aegypti* fueron alimentadas durante 16 horas con el complejo *Effectene*-dsRNA preparado de la siguiente manera: 200µg de dsRNA (1µg de dsRNA por larva) correspondientes al segmento dsALP, fueron aforados a un volumen final de 2ml con buffer EC (Qiagen). Se adicionaron 0.6ml de *Enhancer* (Qiagen), se mezcló la muestra e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Después se agregaron 0.975ml del agente lipídico *Effectene* y se incubó la mezcla por 15 minutos a temperatura ambiente para, finalmente, obtener el complejo *Effectene*-dsRNA con el que se alimentó a las larvas. La mezcla con el complejo *Effectene*-dsRNA se aforó a un volumen final de 20ml con agua destilada donde las 200 larvas del mosquito se alimentaron con el dsRNA. Las larvas se mantuvieron en este volumen durante 16 horas. Posteriormente, se aforó el recipiente que contenía las larvas a un volumen de 100ml con agua destilada y se alimentaron con una mezcla de croquetas de ratón, extracto de levadura y lactoalbúmina. Las larvas fueron monitoreadas y alimentadas con la mezcla alimenticia hasta alcanzar el cuarto instar de su desarrollo.

El grupo control para cada ensayo fueron 200 larvas recién eclosionadas alimentadas con *Effectene* sin dsRNA durante 16 horas, preparado como se describió anteriormente, y posteriormente alimentadas con la mezcla alimenticia hasta alcanzar el cuarto instar de su desarrollo.

5.8 Extracción de RNA de larvas alimentadas con dsRNA y RT-PCR semicuantitativo

Una vez que las larvas alimentadas con *Effectene*-dsRNA, o sólo con *Effectene* (grupo control), alcanzaron el cuarto instar se realizó la disección de los intestinos para extraer el RNA total.

Para la extracción del RNA total se utilizaron 40 intestinos extraídos por disección, almacenados en buffer estabilizante *RNA/later* (Qiagen) a -80°C . Posteriormente, se realizó la lisis mecánica en frío de las muestras de intestino y el RNA se purificó con *RNeasy Proyect kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante para muestras de tejido animal. Se usaron columnas tratadas con DNAsa para obtener un producto más puro. El RNA total purificado se cuantificó usando el espectrofotómetro *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific) midiendo la absorbancia a 260nm. Para calcular la concentración de RNA en las muestras, se utilizó la fórmula: 1 densidad óptica (O.D.) a 260 nm = $40\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNA. Se determinó la pureza de la muestra al determinar el cociente 260/280nm, utilizando sólo las muestras cuyo cociente fuera mayor a 1.8.

Para obtener cDNA a partir del RNA total purificado de cada grupo experimental se realizó un RT-PCR utilizando la transcriptasa *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen) de la siguiente manera:

Se diluyó $1\mu\text{g}$ de RNA en agua libre de RNAsas para obtener una concentración de $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se mezclaron $10\mu\text{l}$ de RNA ($0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) con $1\mu\text{L}$ de oligo-dT ($0.8\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Roche) y $4\mu\text{L}$ de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10mM cada uno) (dNTP mix, Roche). Posteriormente, la mezcla se incubó a 65°C durante 5 minutos y después se incubó en hielo durante 1 min. Para completar la reacción, se agregaron $4\mu\text{l}$ de buffer de reacción 5X

(250mM Tris-HCl, pH 8.3 a temperatura ambiente; 375mM KCl; 15mM MgCl₂, Invitrogen), 1μL de ditionotretol (DTT, 0.1M), 1μl de *RNAse out* (Invitrogen), y 1μl de *SuperScript II* (Invitrogen). Esta mezcla se resuspendió y se incubó a 50°C durante 1 hora. Finalmente, para inactivar la reacción, la mezcla se incubó por 5 minutos a 70°C.

El cDNA obtenido se utilizó para realizar un PCR utilizando los oligonucleótidos correspondientes al fragmento de 374pb de ALP1 y se amplificó un fragmento de 250pb del gen α -tubulina (AAEL006179) como control interno. La reacción se realizó con las condiciones descritas en la sección 5.4. El producto del PCR de los genes se analizó por electroforesis en agarosa ultra pura al 2% teñida con bromuro de etidio, el cual se digitalizó en un analizador de imágenes (BioRad Multianalyst), a partir del cual se cuantificaron las densidades de las bandas transformándolas en densidades ópticas. La densidad óptica del mensajero ALP1 se dividió entre la densidad óptica del control interno tubulina para obtener el nivel de expresión del transcrito ALP1.

5.9 PCR en tiempo real (qPCR)

Se extrajo el RNA total de los intestinas de las larvas alimentadas con dsRNA y de su respectivo control, y a partir de este RNA, se sintetizó por retro-transcripción, cDNA de cada una de ellas, tal y como se describió en la sección 5.8. %. El cDNA obtenido se cuantificó usando el *NanoDrop 2000* (ThermoScientific) midiendo la absorbancia a 260nm. Para calcular la concentración de cDNA en las muestras, se utilizó la fórmula: 1 densidad óptica (O.D.) a 260 nm= 33μg/ml de cDNA, de acuerdo a la recomendación del fabricante (*SuperScript II Reverse Transcriptase Manual*, Invitrogen). Se determinó la pureza de la muestra al determinar el cociente 260/280nm, utilizando sólo las muestras cuyo cociente fuera mayor a 1.8.

En este ensayo se utilizó la expresión constitutiva del transcrito de la proteína ribosomal RPS3 como control y la cuantificación del transcrito de ALP1 se realizó utilizando los oligonucleótidos para el fragmento qALP. La cuantificación de los transcritos de Rps3

(control) y qALP, se llevó a cabo por PCR en tiempo real (qPCR) empleando el equipo *Light Cycler 480 II* (Roche®), usando el sistema de detección de *SYBER Green* (Fermentas®). La mezcla de reacción consistió de: 10µl de *SYBR Green* (Fermentas®), 1µl de cDNA (5ng), 1µl de oligonucleótido *forward* (250nM), 1µl de oligonucleótido *reverse* (250nM) y 7µl de H₂O estéril libre de nucleasas. Las condiciones de reacción fueron: 1 ciclo a 95°C por 10 min, 1 ciclo a 95°C por 15 segundos y 1 ciclo a 60°C por 1 minuto; los dos últimos pasos se repitieron 40 veces. Se empleó un control interno que consistió en la misma reacción anterior sin administrar cDNA. Todas las reacciones fueron realizadas por triplicado. El nivel de transcrito de RPS3 fue usado como control interno para normalizar los niveles de los transcritos del gen a evaluar. Los datos se analizaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ reportado por Livak and Schmittgen, 2001.

5.10 Extracción de proteínas totales.

Una vez que las larvas alimentadas con *Effectene*-dsRNA, o sólo con *Effectene* (Control), alcanzaron el cuarto instar se realizó la disección de los intestinos para extraer proteínas totales.

Para la extracción de proteínas totales se utilizaron 40 intestinos extraídos por disección, cada intestino se lavó con 15µl de PBS 1X PMSF 2mM, se depositaron en 200µl de una solución de PBS 1X PMSF 2mM, y se almacenaron a -80°C. Posteriormente, se realizó la homogenización en frío, para ello se sonicó cada muestra mediante 3 pulsos de 10 segundos a 20 watts en hielo; se alternó cada pulso con 1 minuto de reposo en hielo. Después, se centrifugaron las muestras a 10000 rpm por 2 minutos, y se tomó el sobrenadante para cuantificar proteína total mediante el método de Lowry.

5.11 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína de las muestras de intestino fue determinada por el método de Lowry (BioRad), mientras que la concentración de toxinas fue determinada por el método de Bradford (BioRad). Con ambos métodos se tomó como referencia una curva

estándar de albúmina sérica bovina (BSA, BioRad) (Bradford, 1976).

Cuantificación de proteínas por el 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 20µl de solución S). Se tomaron 5µl de muestra y se agregaron 125µl de la mezcla preparada anteriormente, se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente, se adicionó 1ml de la solución B y se incubó durante 15 minutos. La absorbancia de las muestras se midió a 750nm y los datos obtenidos fueron referenciados empleando una curva estándar de BSA.

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

La cuantificación de la proteína se realizó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 595nm. Se tomaron 10µl de la muestra, y se aforó con agua a un volumen de 800µl. Esta solución fue mezclada por pipeteo, y se agregaron 200µl 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.

5.12 Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los SDS-PAGE se prepararon al 12%, tal y como se describe en Laemmli et al., 1970. Se cargaron 20µg de proteína total por pozo, y se realizó la separación electroforética utilizando una fuente de poder a 15mA durante 2 horas. Finalmente, el gel con las proteínas separadas por peso molecular se transfirió en una cámara húmeda a una membrana PVDF (fluoruro de polivinidileno) durante 1 hora a 350mA a 4°C para realizar la inmunodetección de ALP1 mediante un anticuerpo policlonal anti-ALP.

5.13 Electroforesis bidimensional (2D-E)

Limpieza de la muestra. Para tener efectividad en el análisis de una muestra de proteína en doble dimensión, es necesario evitar las impurezas o sustancias (tales como: sales, detergentes iónicos, lípidos, ácidos nucleicos, ácidos fenólicos, etc.) que podrían interferir o modificar el proceso del isoelectroenfoco (IEF) de las proteínas, así como su análisis

electroforético en geles de doble dimensión (2D-E). Por lo tanto, cada una de las muestras se procesó con *2-D Clean Up kit* (Amersham Biosciences). El método consiste en la precipitación de las proteínas, y posteriormente, en la eliminación de las sustancias (descartadas en solución) que puedan interferir con el buffer de rehidratación del IEF (Amersham Biosciences Corp., 2003). El procedimiento fue el siguiente:

100µL del homogenado intestinal se mezclaron con 300µl de la solución precipitante (Amersham Biosciences) y se incubó durante 15 minutos a 4°C. Luego, se agregaron 300µl de la solución co-precipitante (Amersham Biosciences), se agitó la mezcla, y se centrifugó a 12000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante fue eliminado y se agregaron 40µl de la solución co-precipitante a la pastilla formada, que se incubó por 5 minutos a 4°C. Después, la mezcla se centrifugó a 12000 x g durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y posteriormente, la pastilla se disolvió en 25µL de agua destilada estéril; la mezcla se agitó durante algunos segundos, y a continuación, se le adicionó 1mL de buffer de lavado (Amersham Biosciences) y 5µL de aditivo de lavado (Amersham Biosciences). La mezcla se agitó hasta dispersar la pastilla y después se incubó a -20°C durante 2 horas. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 12000 x g durante 5 minutos, el sobrenadante se desechó y la pastilla se dejó secar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 100µL de buffer de rehidratación del isoelectroenfoco (urea 8M, CHAPS 2%, buffer IPG 0.5% v/v pH 3-10, azul de bromofenol 0.002% m/v, DTT 0.56M) (Amersham Biosciences Corp. 2003).

Cuantificación de proteínas. El análisis en 2D-E requiere de la cuantificación exacta de las proteínas de una muestra. Esta se realizó con *2-D Quant kit* (Amersham Biosciences). Este método permite cuantificar proteínas en el buffer de rehidratación sin ningún tipo de interferencia. El principio de este método consiste en la precipitación de las proteínas, con la eliminación de las sustancias que podrían interferir con los procesos de IEF y 2D-E, y su posterior unión específica a iones de cobre. La densidad del color es inversamente proporcional a la concentración de proteínas, y es detectada a una longitud de onda de 480nm (Amersham Biosciences Corp., 2003) El procedimiento fue el siguiente:

1.- Se realizó una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) con un rango de detección de 0-50µg/µl de proteína de acuerdo a la siguiente tabla:

Preparación de curva estándar						
Número de Tubo	1	2	3	4	5	6
Volumen de la solución BSA estándar (2mg/ml)	0µl	5µl	10µl	15µl	20µl	25µl
Cantidad de proteína	0µg	10µg	20µg	30µg	40µg	50µg

2.- Se tomaron 2.5µl de los homogenados intestinales problema (por duplicado) y se depositaron en tubos de microcentrífuga.

3.- A todos los tubos (curva estándar y problema) se les agregaron 100µl de la solución precipitante (Amersham Biosciences) y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 100µl del co-precipitante (Amersham Biosciences) y se centrifugó la mezcla a 10000 x g durante 10 minutos.

4.- Posteriormente, se le agregaron 20µl de solución de cobre y 80µl de agua miliQ, y la mezcla se agitó para disolver a la pastilla. Finalmente, se añadieron 200µl de la solución de color (que contiene 100 partes del reactivo A por una del reactivo B, Amersham Biosciences) y se incubaron las muestras durante 20 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia de las muestras se detectó a una longitud de onda de 480nm usando un espectrofotómetro Emax (Molecular Devices, EUA).

Isoelectroenfoque (IEF) o primera dimensión. Se tomó una alícuota de 70µg de proteína y se le agregó buffer de rehidratación para aforar a un volumen final de 125µL. La mezcla se depositó dentro de un contenedor (sarcófago) y se colocó sobre ésta la tira que contiene el gel de poliacrilamida con el gradiente de pH inmovilizado (IPG, Immobiline DryStrip pH 3-10 NL, 7 cm); se cubrió con aceite mineral (DryStrip Cover Fluid) con la finalidad de evitar la evaporación de la muestra durante la hidratación de la tira y el posterior isoelectroenfoque de las proteínas. Los contenedores fueron colocados en el equipo de isoelectroenfoque Ettan IPGphor. El tiempo de rehidratación del gel fue de 5 horas a una corriente constante de 50µA por tira. El programa de ciclos de voltaje para el isoelectroenfoque fue el siguiente: Ciclo 1: 30 minutos a 500 Volts; Ciclo 2: 30 minutos a 1000 Volts; Ciclo 3: 1.6 horas a 5000 Volts.

Una vez que transcurrió el tiempo de isoelectroenfoque, los geles fueron equilibrados en un tubo con un amortiguador (Tris-HCl 50mM pH 8.8, urea 6M, glicerol 30% v/v, SDS 2% m/v, azul de bromofenol 0.002% m/v) suplementado con DTT (50mg/5ml), durante 15 minutos. Posteriormente, el gel se transfirió a otro tubo con el mismo amortiguador de equilibrio pero suplementado con iodoacetamida (125mg/5ml), y se incubó durante 15 minutos. Una vez que los geles se equilibraron en los amortiguadores, se eliminó el excedente de líquido.

Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE o segunda dimensión. Después de equilibrar a los geles de la primera dimensión, se llevó a cabo la separación de las proteínas en geles de poliacrilamida. La composición de los geles de poliacrilamida fue del 12% y fueron colocados en cámaras de electroforesis a una corriente constante de 20mA en el cuarto frío durante 2 horas.

5.14 Inmunodetección de ALP1 por *Western- blot*

El PBS (NaCl 8.5g, NaH₂PO₄ 0.38g, Na₂HPO₄ 1.02g en un litro de agua destilada a pH 7.2), está hecho a base de fosfatos y se utilizó como buffer en los ensayos tipo *Western-Blot*.

Las proteínas del homogenado intestinal, se separaron mediante una electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE) o mediante una electroforesis en 2D de acuerdo a lo descrito en la sección 5.10 y 5.13, respectivamente. Una vez separadas las proteínas, se transfirieron a una membrana PVDF (Millipore) durante una hora a 350mA en una cámara húmeda a 4°C, usando buffer de transferencia (20% de metanol en buffer Tris-glicina 1X). Al terminar la transferencia, la membrana se enjuagó con PBS 1X y se bloqueó durante 1 hora con PBS 1X 0.1% *Tween20* con leche descremada al 5%. Posteriormente, se enjuagó la membrana con PBS 1X 0.1% *Tween20* con agitación manual. Después, la membrana se incubó con el anticuerpo primario policlonal anti-ALP en una relación 1:5000 en PBS 1X 0.1% *Tween20* durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Al concluir el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó con PBS 1X 0.1% *Tween20*, y se incubó con el anticuerpo secundario (anti-conejo) acoplado a peroxidasa (Sigma) en una relación

1:10000 en PBS 1X 0.1% *Tween20* durante 1 hora en agitación. Finalmente, la membrana se lavó una vez más con PBS 1X 0.1% *Tween20*, y se incubó por 1 minuto con los reactivos de quimioluminiscencia (Thermo SCIENTIFIC), como se indica por el fabricante, para visualizar la señal de la interacción sobre una película fotográfica (Amersham, Hyperfilm™ ECL).

5.15 Bioensayos

Para realizar los bioensayos se empleó como parámetro de referencia la dosis letal 50 (LC₅₀) de las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba, es decir, la concentración de toxina requerida en ng/ml para que el 50% de la población de larvas muera. Para esto, se realizó un ensayo alimentando grupos de 10 larvas silvestres de cuarto instar en 100ml de agua por triplicado, con diferentes dosis de espora-cristal de cada toxina (Cry11Aa y Cry4Ba), en un rango de concentraciones que provocó desde 10 a 90% de mortalidad de las larvas 24 horas después de administrar la toxina. Con estos datos fue posible calcular la LC₅₀ para ambas proteínas, usando el método de Probit mediante el programa estadístico Polo-PC *LeOra Software*.

Las larvas de cuarto instar que fueron alimentadas con el complejo *Effectene*-dsRNA y las larvas control fueron tratadas con la concentración LC₅₀ de espora-cristal de la toxina Cry11Aa o Cry4Ba durante 24 horas. Para cada toxina se realizaron al menos tres experimentos independientes, en donde cada dosis se administró en cuatro o cinco grupos de 10 larvas de cuarto instar de cada grupo experimental, en un volumen de 100ml de agua. Al transcurrir 24 horas, se evaluó la mortalidad de la población ensayada.

5.16 Análisis estadístico

Los datos de mortalidad en los bioensayos con las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa se analizaron a través de la prueba de U-Mann-Whitney. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de probabilidad (p) fue menor a 0.05.

Los datos de expresión de mRNA de ALP1 se analizaron mediante una prueba t- student para muestras independientes con varianzas iguales. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de p fue menor a 0.05. Ambos análisis se llevaron a cabo usando el software GraphPad Prism 5.01 para Windows 7.

6. RESULTADOS

Hasta el momento de este estudio, no existía evidencia *in vivo* que sustentara el papel de la ALP1 de mosquitos como receptor de Cry11Aa y Cry4Ba. Por esta razón, se decidió validar su función alimentando larvas de mosquito con dsRNA, silenciando la expresión de la proteína.

6.1 Identificación de regiones potenciales para sintetizar dsRNA.

Realizando un alineamiento a nivel de secuencia nucleotídica de los genes de ALP1, ALP2 y ALP3, se identificaron las regiones potenciales del gen ALP1 para sintetizar dsRNA. Estas regiones no están conservadas en, al menos, los otros dos genes de ALP de *A. aegypti* previamente secuenciados. Con base en esto, se seleccionó una región a la que se denominó dsALP, que es parte de la región 3' no codificante del gen. Esta región génica se clonó en el vector *pLitmus-28i* para sintetizar el dsRNA del fragmento mediante el uso de la polimerasa T7 y del promotor T7, el cual flanquea a la región clonada en el vector.

De la misma forma, se realizó la selección de las regiones ALP y qALP para evaluar la eficiencia del silenciamiento de ALP1 midiendo el transcrito mediante PCR (semicuantitativo y cuantitativo, respectivamente) después de alimentar a las larvas de mosquito con dsALP.

6.2 Clonación de dsALP en *pLitmus-28i*

El fragmento dsALP fue aislado y amplificado por PCR, de acuerdo a lo descrito en Metodología, utilizando como molde el DNA plasmídico extraído de la clona de ALP1 recombinante que tenemos en el laboratorio (Fernández et al. 2009). La figura 11 muestra el producto de PCR obtenido al utilizar los oligonucleótidos específicos para dsALP. Este fragmento fue clonado en el vector *pLitmus-28i*, siguiendo el protocolo descrito en Metodología.

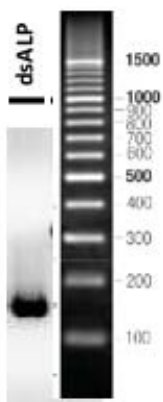


Figura 11. Producto de PCR del fragmento dsALP de ALP1 en *Aedes aegypti*

6.3 Síntesis de dsRNA de la región dsALP

Utilizando el DNA plasmídico de la clona de *E. coli* que se transformó con la construcción dsALP-pLitmus-28i, se realizó la transcripción *in vitro* para obtener el dsRNA de la región dsALP. En la figura 12 se muestra el dsRNA antes y después de purificarse mediante una extracción con fenol-cloroformo. Una vez que se cuantificó el dsRNA, se realizó el experimento de RNAi con larvas neonatas de *A. aegypti*.

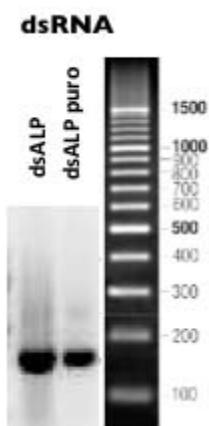


Figura 12. dsRNA del fragmento dsALP sintetizado mediante HiScribe RNAi Transcription Kit. El dsRNA producido se purificó a través de una extracción con fenol-cloroformo.

6.4 Alimentación de larvas de *A. aegypti* con dsRNA

Se alimentaron larvas recién eclosionadas de *A. aegypti* con el RNA de doble cadena dsALP purificado, 1µg de dsRNA por larva. Se observó que debido a la administración del complejo *Effectene*-dsRNA o sólo el *Effectene*, ni la morfología de las larvas, ni el tamaño promedio de ellas cambiaron durante cada instar. De las larvas alimentadas con dsALP en

los distintos experimentos independientes realizados, sobrevivió en promedio el 94.5% (± 3.9) de las larvas hasta cuarto instar. Adicionalmente, en el caso del grupo control (larvas alimentadas con *Effectene* sin dsRNA), sobrevivió en promedio el 97.6% (± 1.5) de las larvas hasta cuarto instar.

Normalmente, el tiempo promedio de una larva de *A. aegypti* para alcanzar el cuarto instar después de eclosionar es de 168 horas (Harrington et al., 2001). En los ensayos realizados, este lapso se extendió de 24 a 48 horas en ambos grupos experimentales. Sin embargo, este tiempo extra que les tomó llegar al cuarto instar está dentro del rango de variación normal (Harrington et al., 2001).

6.5 Análisis de la eficiencia del silenciamiento de la ALP en larvas de *A. aegypti* mediante RT-PCR semicuantitativo.

Con el objetivo de comprobar si fue efectivo el silenciamiento de ALP1 en las larvas alimentadas con dsRNA, se realizó la disección de los intestinos de las larvas a partir de los cuales se purificó el RNA total. Después, se realizó un ensayo RT-PCR en el que se utilizaron los oligonucleótidos para el fragmento de 374pb de ALP1 y los oligonucleótidos para el fragmento de 250 pares de bases de α -tubulina de *A. aegypti*, y los productos del PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 12% (figura 13). El gen tubulina, se utilizó como control interno de expresión constitutiva (Cancino-Rodezno et al., 2010).

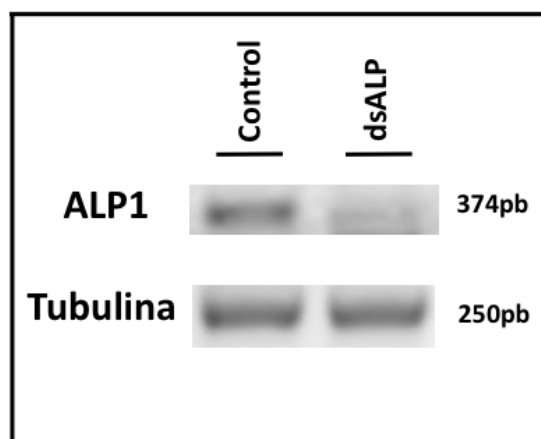


Figura 13. Silenciamiento de ALP1 en larvas de *Aedes aegypti*. El transcrito de ALP1 se analizó por electroforesis de los productos PCR.

El gel de agarosa con la separación electroforética de los productos del PCR, se digitalizó en un analizador de imágenes (BioRad Multianalyst), a partir del cual se cuantificaron las densidades de las bandas transformándolas en densidades ópticas (D.O.). Se determinó el cociente D.O.ALP1/ D.O.tubulina en el grupo control y en el grupo alimentado con dsALP. Al comparar y graficar los niveles del transcrito del gen ALP1, se observó una disminución del 80% (± 1.5) en los niveles del RNA mensajero de ALP1 en aquellas larvas que fueron alimentadas con *Effectene*-dsALP, comparado con aquellas larvas control alimentadas sólo con *Effectene* ($n=3$; $p<0.0001$) (figura 14).

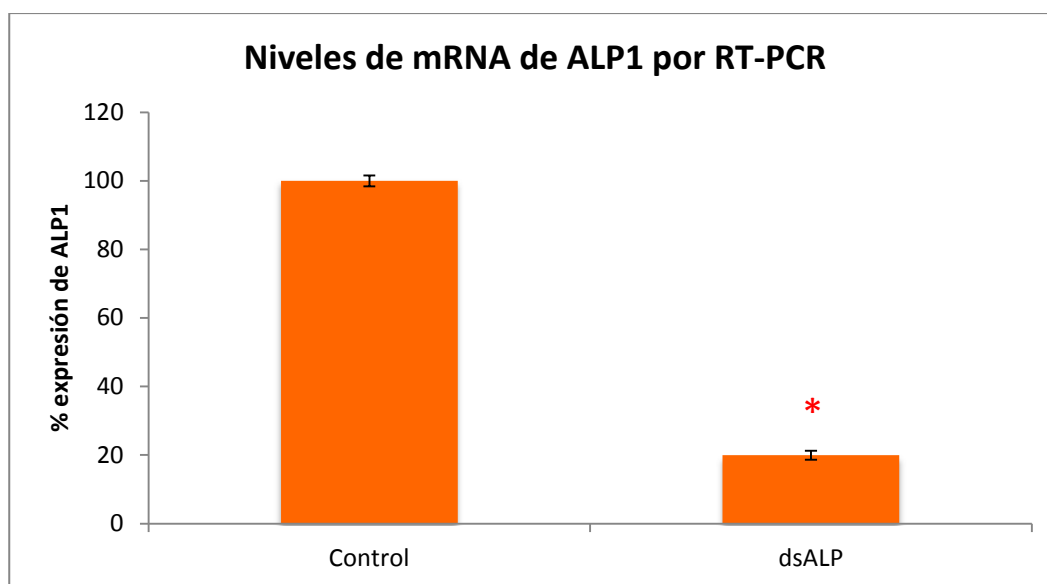


Figura 14. Niveles de mRNA de ALP1 en larvas alimentadas con dsALP comparado con las larvas control alimentadas sólo con *Effectene*. El porcentaje de reducción de la banda fue calculado usando un analizador de imágenes BioRad Multianalyst.

6.6 Análisis de la eficiencia del silenciamiento de la ALP1 mediante qPCR

Para corroborar el resultado obtenido en el RT-PCR semicuantitativo se realizó un PCR cuantitativo (qPCR) usando el equipo Light Cycler 480 II (Roche) y el sistema de detección de SYBR Green (Fermentas®). En este ensayo se utilizaron los oligos qALP para analizar la expresión del gen ALP1 mediante qPCR. La expresión constitutiva del gen ribosomal RPS3 se utilizó como control interno del ensayo para normalizar los niveles del transcrito de ALP1. Los resultados obtenidos mediante qPCR mostraron que la expresión relativa de ALP1 fue reducida 75% en el grupo de larvas alimentadas con dsALP, comparado con el grupo control (figura 15).

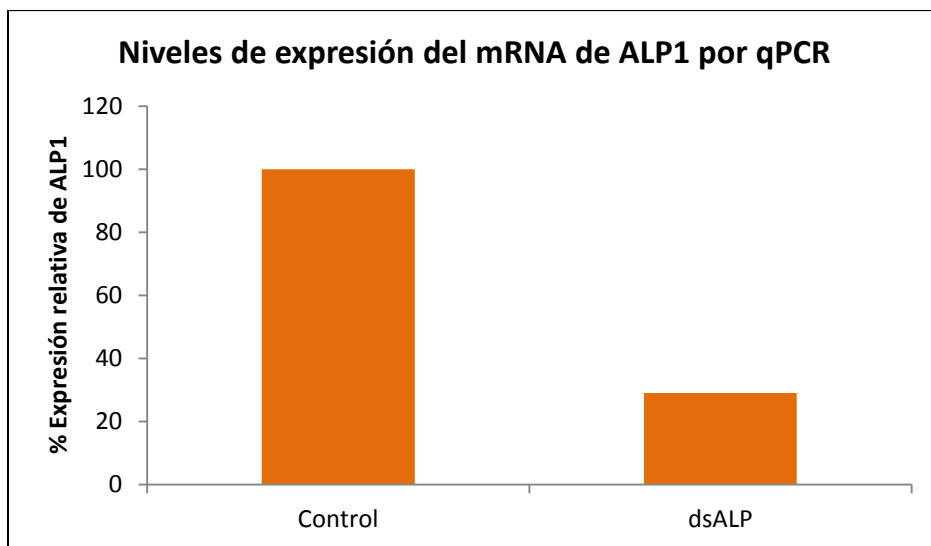


Figura 15. Expresión relativa de ALP1 en larvas de *A. aegypti* alimentadas con dsALP.

6.7 Análisis del silenciamiento de la ALP1 mediante *Western-blot*

A partir de los intestinos de larvas que fueron alimentadas con *Effectene*-dsRNA y su control, se preparó un extracto de proteína total mediante sonicación, para posteriormente determinar mediante *Western-blot* si se obtuvo un efecto en la expresión de la proteína ALP1. El control de referencia de este experimento fue la proteína actina cuya expresión se mantuvo sin cambios (Cancino-Rodezno et al., 2010). Después de incubar la membrana con un anticuerpo policlonal anti-ALP, no se detectó un cambio aparente en la expresión de la proteína ALP1 entre las larvas silenciadas y el control experimental (figura 16).

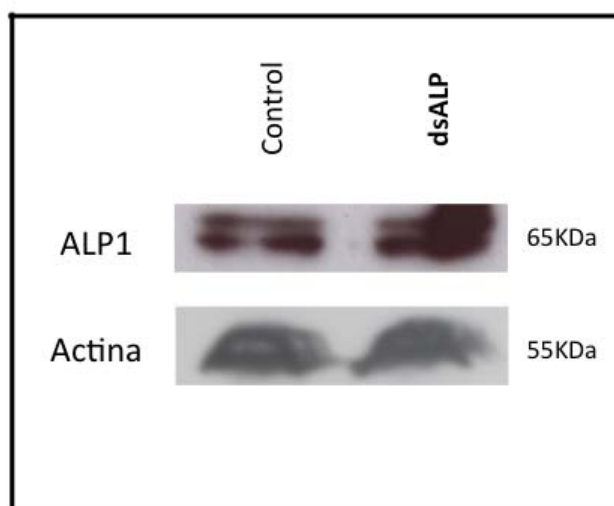


Figura 16. Análisis del silenciamiento de ALP1 en larvas de *A. aegypti* mediante *Western-blot*.

El anticuerpo policlonal anti-ALP utilizado se obtuvo a partir de la inmunización de conejos con la proteína ALP1 recombinante producida en *E. coli* (Fernández et al., 2009). Un *screening* del genoma de *Aedes aegypti* usando la secuencia de mALP reveló 13 isoformas diferentes de fosfatasas alcalinas incluyendo a la ALP1 (Dechklar et al., 2011). De estas 13 secuencias de fosfatasas alcalinas, al menos ocho se expresan en el intestino del insecto, incluyendo a ALP1 (Fernández et al., 2009; Dechklar et al., 2011; Bayyareddy et al., 2009; <http://funcgen.vectorbase.org/ExpressionData/>). Con base en esto, y debido a que el *Western-blot* a partir de la separación electroforética en una dimensión de proteínas intestinales, no mostró ningún efecto sobre los niveles de proteína de ALP1 en las larvas silenciadas, se realizó el análisis de la expresión de esta proteína mediante *Western-blot* a partir de una electroforesis bidimensional (2D-E) de las proteínas intestinales de cada grupo experimental (figura 17).

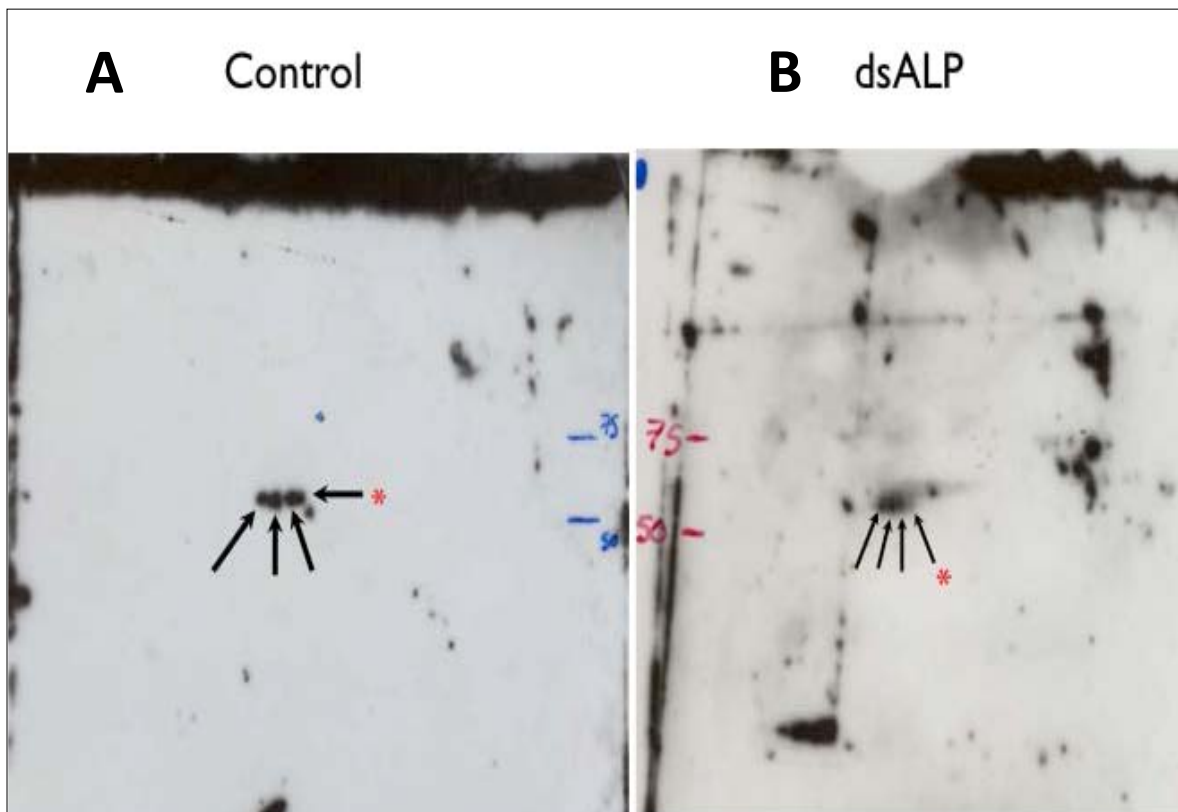


Figura 17. Detección de ALP1 mediante *Western-blot* a partir de proteínas aisladas del intestino de larvas control (A) y de larvas alimentadas con dsALP (B), separadas mediante una electroforesis en dos dimensiones (2D-E). Se usó un anticuerpo policlonal contra ALP1 para la inmunodetección de las proteínas separadas por isoelectroenfoque usando tiras IPG con pH 3-10 y separadas después en gel SDS-PAGE 12%. Con un asterisco se muestra la isoforma que se reduce después de silenciar larvas de *A. aegypti* con dsALP.

En la figura 17A se muestra que el anticuerpo anti-ALP1 reconoce al menos 4 proteínas con un peso molecular similar (65kDa) pero con diferente punto isoeléctrico. El análisis por *Western-blot* del gel 2D-E de las larvas silenciadas mediante dsALP muestra que la isoforma menos ácida se reduce en comparación a las otras tres fosfatasas alcalinas que reconoce el anticuerpo anti-ALP (figura 17B). Esto es consistente con el punto isoeléctrico predicho para cuatro fosfatasas alcalinas: ALP1 (pH 6.8), ALP2 (pH 5.2), ALP3 (pH 6.1) y mALP (pH5.8), aunque las modificaciones post-traduccionales pueden contribuir a la variación de los puntos isoeléctricos de las isoformas de ALP. Este resultado sugiere que la ALP1 se silenció específicamente sin afectar la expresión de otras isoformas de fosfatasas alcalinas intestinales.

6.8 Efecto del silenciamiento de ALP en larvas tratadas con toxinas Cry11Aa y Cry4Ba

Después de haber determinado la eficiencia del silenciamiento de la ALP1 en larvas de *A. aegypti*, se realizaron bioensayos exponiendo a estas larvas a la espora-cristal de Cry11Aa o Cry4Ba. Usando la dosis letal 50 (LC_{50}) calculada previamente para cada toxina (300ng/mL para Cry11Aa, y 35ng/ml para la toxina Cry4Ba), se comparó la toxicidad de estas proteínas entre las larvas silenciadas y las larvas control. En la figura 18 se muestra el efecto del silenciamiento de ALP1 en la respuesta de larvas de *A. aegypti* a Cry11Aa o Cry4Ba. Las larvas silenciadas fueron expuestas a la LC_{50} de las toxinas Cry11Aa o Cry4Ba, mostrando 10% (± 1) o 27% (± 5) de mortalidad, respectivamente ($n=3$; $p<0.05$). Las larvas silenciadas fueron más tolerantes a ambas toxinas en comparación al grupo control, indicando el papel funcional de ALP1 en la toxicidad de estas proteínas Cry en *A. aegypti*. Resulta interesante que, las larvas que tienen silenciada ALP1 fueron más tolerantes a la toxina Cry11Aa en comparación a la Cry4Ba.

Efecto RNAi de larvas de *Aedes aegypti* tratadas con Cry11Aa o Cry4Ba

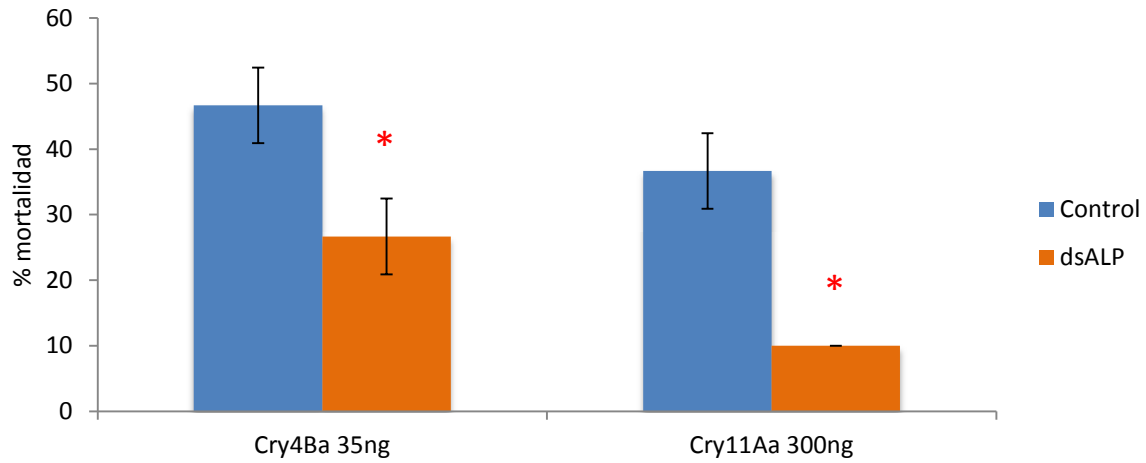


Figura 18. Efecto del silenciamiento de ALP1 en larvas de *A. aegypti* tratadas con la toxina Cry11Aa o Cry4Ba.

En experimentos posteriores, se corroboró que la tolerancia hacia las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba de las larvas de *A. aegypti* alimentadas con dsALP se debe al silenciamiento del gen y no a un efecto inespecífico de la introducción del dsRNA ajeno a las células del mosquito. Para esto, el Dr. Sarjeet S. S. Gill amablemente nos donó una construcción del plásmido *pLitmus-28i*, en donde está clonado un fragmento de 900pb del gen LacZ (*dsLacZ-pLitmus28i*) flanqueado por los promotores T7 del plásmido (figura 9). Se transformaron células de *E. coli* con la construcción *dsLacZ-pLitmus28i*, y siguiendo los pasos de la sección 5.5 y 5.6, se obtuvo el dsRNA correspondiente al fragmento del gen LacZ (*dsLacZ*) clonado en el vector.

Posteriormente, se usaron larvas recién eclosionadas de *Aedes aegypti* que fueron alimentadas con el RNA de doble cadena *Effectene-dsALP*, 1µg de dsRNA por larva, siguiendo el protocolo de la sección 5.7. En este experimento, un segundo grupo control se alimentó con *Effectene-dsLacZ*, usando 1µg de dsRNA por larva.

Al igual que en los experimentos previos, la morfología y el tamaño de las larvas durante cada instar no se afectaron por la administración de dsRNA-Effectene en ninguno de los

grupos experimentales. De las larvas alimentadas con dsALP, sobrevivió el 98.3% de los individuos hasta el cuarto instar de desarrollo, mientras que de las larvas alimentadas con dsLacZ, sobrevivió el 99.3% de los individuos hasta el cuarto instar de desarrollo.

Al comparar la toxicidad de Cry11Aa o Cry4Ba hacia las larvas de *A. aegypti* alimentadas con dsRNAs y las larvas alimentadas sólo con *Effectene* (figura 19), se mostró que la tolerancia hacia las toxinas Cry se debe al silenciamiento del gen ALP1 en las larvas de *A. aegypti*, y no a la alimentación de las larvas con un dsRNA control (dsLacZ).

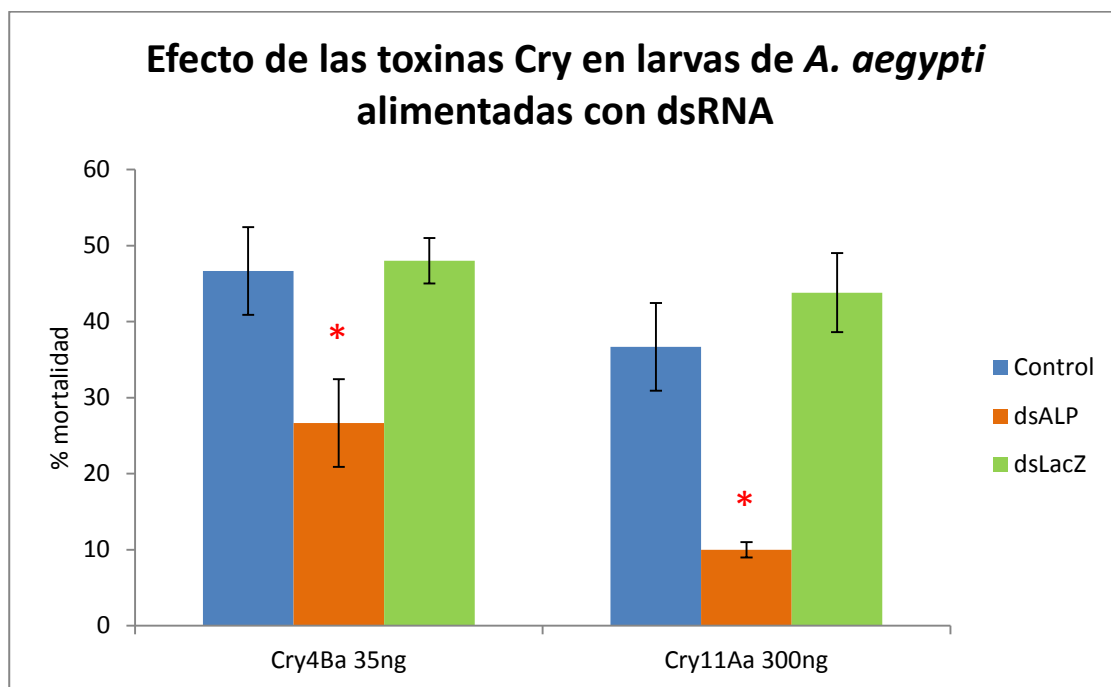


Figura 19. El silenciamiento de ALP1 en larvas de *A. aegypti* proporciona un fenotipo tolerante a las toxinas Cry en comparación al grupo control (larvas alimentadas sólo con *Effectene*), y al grupo de larvas alimentadas con dsLacZ.

6.9 Efecto sinérgico de Cyt1Aa en la actividad de la toxina Cry11Aa en larvas silenciadas en la expresión de ALP1

Para evaluar el efecto sinérgico de la toxina Cyt1Aa en la toxicidad de Cry11Aa en ausencia de ALP1 en larvas de *A. aegypti*, se realizó el silenciamiento por dsRNA de la fosfatasa alcalina 1 mediante el procedimiento previamente descrito. Al realizar los bioensayos con las toxinas Cyt1Aa y Cry11Aa, se utilizaron las dosis letales 10 (LC₁₀) calculadas

previamente usando el método de Probit. La LC_{10} calculada de Cyt1Aa fue 215ng/ml, mientras que la LC_{10} calculada de Cry11Aa fue 178ng/ml. En la figura 20 se representa la toxicidad de las proteínas Cry11Aa y Cyt1Aa hacia las larvas de *A. aegypti* que tienen silenciada la expresión de ALP1. Al administrar la concentración letal 10 (la concentración requerida en ng/ml para que el 10% de la población de larvas muera) de cada toxina por separado, en el grupo control se observó una mortalidad del 10% (± 2.5) y del 11% (± 3.2), con las toxinas Cry11Aa y Cyt1Aa, respectivamente. Al utilizar en este grupo control una mezcla de las LC_{10} de ambas toxinas (Cry11Aa + Cyt1Aa) se observó el efecto sinérgico de las toxinas obteniendo una mortalidad del 72% (± 8.2). Por otra parte, se observó un 5% (± 3.2) de mortalidad de las larvas alimentadas con dsALP al administrar la LC_{10} de la toxina Cry11Aa, y un 8.5% (± 1.5) de mortalidad cuando se utilizó la LC_{10} de Cyt1Aa. Sin embargo, al administrar ambas toxinas a las larvas que tienen silenciada la expresión de ALP1, se observó un efecto sinérgico en la mortalidad que supera al fenotipo tolerante hacia la toxina Cry11Aa.

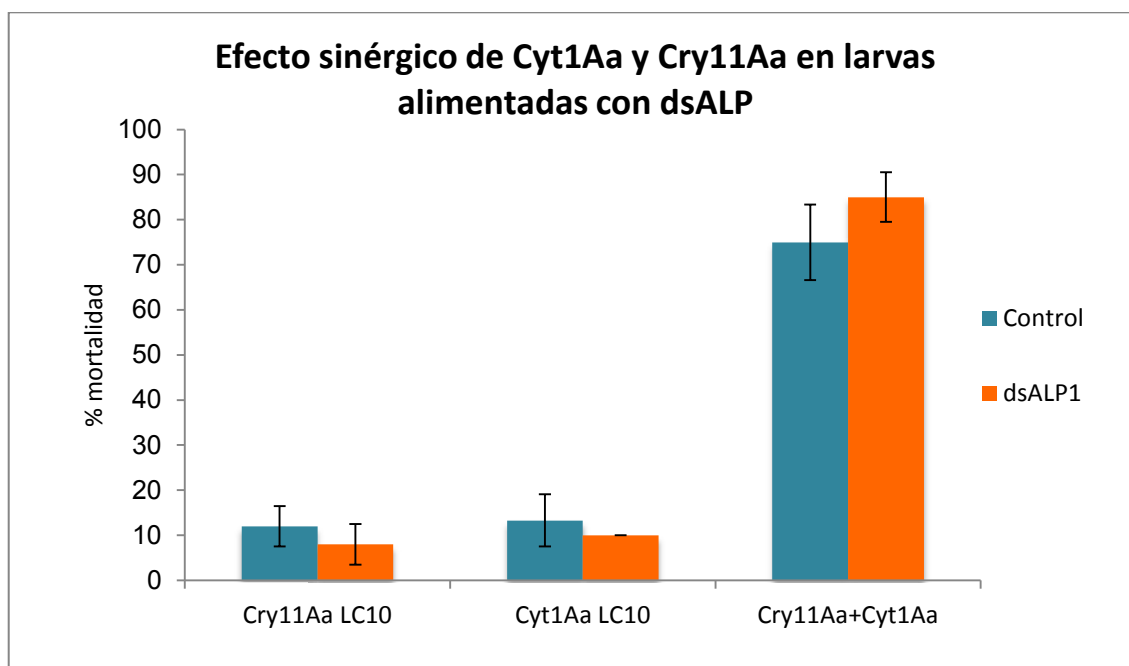


Figura 20. Representación del efecto sinérgico de las toxinas Cyt1Aa y Cry11Aa en larvas de *A. aegypti* con la expresión de ALP1 silenciada.

7. DISCUSIÓN

Previamente, en nuestro grupo de trabajo, se demostró que ALP1 es capaz de interaccionar con las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba en vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA) de *Aedes aegypti* (Fernández et al., 2009). Se generaron mutantes de estas toxinas que no pueden unir a ALP1 y su toxicidad se vio atenuada (Fernández et al., 2009; Reyes Comunicación personal). Los estudios realizados de inmunodetección de la ALP1 muestran que esta se localiza principalmente en las células epiteliales del intestino posterior y en la caeca gástrica (Fernández et al., 2009). Este patrón de distribución es similar al de la proteína cadherina y a las regiones de unión de Cry11Aa en el intestino de *A. aegypti* (Chen et al., 2009a), lo cual apoya la idea sobre la participación activa de ambos receptores (cadherina y ALP1) en el modo de acción de la toxina.

No obstante, era importante demostrar el papel *in vivo* de ALP1 en el mecanismo de acción de las toxinas Cry en *A. aegypti*. La manera en que se mostró esto fue disminuyendo la expresión de esta proteína mediante la técnica de interferencia por dsRNA. A través de este estudio se logró identificar una región para silenciar la expresión de ALP1 en larvas de *A. aegypti*, y se demostró un silenciamiento eficiente al alimentar larvas neonatas con *Effectene-dsALP*, ya que el mRNA de ALP1 disminuyó del 75 al 80% ($n=3$; $p<0.0001$) en larvas alimentadas con la construcción de silenciamiento.

Para evaluar el efecto del silenciamiento de ALP1 en la toxicidad de Cry11Aa y Cry4Ba, se realizaron bioensayos utilizando la dosis LC_{50} de estas toxinas. Estas dosis fueron calculadas previamente en larvas silvestres de *A. aegypti* (35ng/mL para Cry4Ba y 300ng/mL para la toxina Cry11Aa), y se corroboró que estuvieran dentro del rango de toxicidad reportado para ambas toxinas. La LC_{50} reportada para la toxina Cry4Ba tiene un rango que va de 33-102ng/ml (Cantón et al., 2011), mientras que para la toxina Cry11Aa el rango de LC_{50} reportado va de 235-499ng/mL (Pérez et al., 2005). En este trabajo, se

encontró que las larvas que tienen silenciada ALP1 al ser expuestas a la LC_{50} de las toxinas Cry4Ba o Cry11Aa presentan una mayor tolerancia a la toxicidad provocada por la ingestión de alguna de las dos toxinas, con respecto a las larvas control. Lo cual demuestra que ALP1 es una molécula importante que está involucrada en la toxicidad de Cry11Aa y Cry4Ba.

Para demostrar que el fenotipo obtenido fue debido al silenciamiento específico de ALP1, utilizamos un dsRNA irrelevante (dsLacZ), donado por el Dr. Sarjeet S.S. Gill. El gen LacZ no está reportado en el genoma de *A. aegypti*, por lo que no se silenció ningún gen al administrar el dsLacZ. El resultado de nuestro ensayo mostró que la diferencia observada entre la toxicidad de Cry11Aa hacia las larvas se debe al silenciamiento del gen ALP1 en las larvas de *A. aegypti*, y no a la alimentación de las larvas con un dsRNA control (figura 19). Este resultado es consistente con el trabajo reportado por Saenwiman et al., 2011, donde se silenciaron 3 isoformas diferentes de APN individualmente y la susceptibilidad a la toxina Cry4Ba disminuyó cuando se silenciaba cada una de las APNs, mientras que no observaron ningún efecto en la mortalidad de las larvas tratadas con Cry4Ba después de la administración de dsGFP, utilizado como dsRNA control (irrelevante).

Interesantemente, las larvas que tienen silenciada ALP1 muestran mayor tolerancia a la toxina Cry11Aa que a Cry4Ba. Esto podría atribuirse a que la toxina Cry4Ba además de unirse a ALP1 también se une a otros receptores anclados por GPI que han sido descubiertos recientemente y que, por lo tanto, puede seguir actuando a través de esos receptores aún en ausencia de ALP1 (Dechklar et al., 2011; Saengwiman et al., 2011). En el trabajo de Dechklar, se demostró que la expresión de mALP en una línea celular de insecto Sf9 le confiere susceptibilidad a la toxina Cry4Ba (Dechklar et al., 2011). El mismo grupo de trabajo identificó tres diferentes isoformas de APN ancladas por GPI que al ser silenciadas por dsRNA le confieren a las larvas un fenotipo tolerante a la toxina Cry4Ba; sin embargo, el silenciamiento de una isoforma de APN en particular (APN2783), le confiere un fenotipo más fuerte de tolerancia contra la toxina Cry4Ba que el silenciamiento de las otras dos

isoformas de APN, indicando de esta forma su papel predominante en el mecanismo de acción de la toxina (Saengwiman et al., 2011).

Es importante señalar que en ninguno de los estudios realizados de RNAi se ha observado que la toxicidad de Cry4Ba se abata por completo. Por lo tanto, es posible que las diferentes moléculas ancladas por GPI implicadas en la toxicidad de Cry4Ba puedan estar involucradas en diferentes pasos del mecanismo de acción de esta toxina, y que la inactivación de uno de ellos no es suficiente para inactivar por completo la actividad de la toxina.

Aunque las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba comparten algunos receptores proteicos anclados por GPI, éstas moléculas tienen un papel diferencial en la toxicidad de estas proteínas Cry. Esto parece también ser el caso de las diferentes isoformas de APN que mostraron estar implicadas en la toxicidad de Cry4Ba, donde el silenciamiento de APN2783 muestra un mayor efecto en la toxicidad, mientras que otra de las isoformas silenciadas (APN2778) en este trabajo es AaeAPN1, caracterizada anteriormente como receptor de Cry11Aa (Chen et al., 2009b).

Finalmente, para analizar el papel de ALP1 en el efecto sinérgico de las toxinas Cyt1Aa y Cry11Aa, utilizamos la LC_{10} calculada para cada toxina en larvas alimentadas con dsALP y larvas control. Se utilizó la dosis letal LC_{10} de estas toxinas para detectar fácilmente el efecto sinérgico, debido a que la toxicidad de diferentes combinaciones de toxinas Cry de Bti es mayor que la suma de las toxicidades esperadas de las toxinas individuales (Wu et al., 1994; Pérez et al., 2005; Cantón et al., 2011). El resultado de estos experimentos reveló que existe un efecto sinérgico similar en ambos grupos experimentales (figura 20). Además, el sinergismo conferido por la adición de las toxinas Cyt1Aa y Cry11Aa juntas, enmascara el fenotipo tolerante hacia la toxina Cry11Aa en las larvas que tienen silenciada ALP1. El reporte previo de Pérez et al., 2005, demuestra que la unión de la toxina Cry11Aa a Cyt1Aa facilita la formación de una estructura oligomérica de 250kDa de Cry11Aa, la cual

es capaz de formar un poro (Pérez et al., 2007). Adicionalmente, sabemos que Cry11Aa se une a Cyt1Aa a través del asa α -8 del dominio II, esta región de la toxina también está involucrada en la interacción con el receptor ALP1 y cadherina (Fernández et al., 2006; Chen et al., 2009a).

Tomando en cuenta el papel de Cyt1Aa como receptor de Cry11Aa en la formación de la estructura pre-poro, y los diferentes receptores anclados por GPI reportados para esta toxina, suponemos que el papel de ALP1 en la inserción de la estructura oligomérica podría ser reemplazado por AaeAPN1, o incluso por otras proteínas ancladas por GPI que aún no han sido reportadas como moléculas que participan en la toxicidad de la proteína Cry11Aa. Es probable que los receptores descritos para Cry4Ba, también tengan un papel en la toxicidad de Cry11Aa y éstos, reemplacen la función de ALP1 en el modo de acción de Cry11Aa durante el sinergismo con la toxina Cyt1Aa. Es necesario realizar los experimentos correspondientes para dilucidar los eventos involucrados en este fenómeno de sinergismo.

8. CONCLUSIONES

Se demostró que la interferencia de la expresión de ALP1 mediante la administración de dsALP disminuye entre un 75 y 80% los niveles del transcrito de ALP1 al cuantificarlo por qPCR, y la expresión de la proteína con el punto isoeléctrico a un pH de 6.8, correspondiente a ALP1, disminuye en las larvas silenciadas.

El silenciamiento de ALP1 mediante la administración de dsALP disminuyó la mortalidad de *Aedes aegypti* al ser sometidas a Cry11Aa y Cry4Ba, aunque se observó una mayor tolerancia hacia la toxina Cry4Ba que a Cry11Aa.

Nuestros resultados, junto con lo reportado en el silenciamiento de las diferentes isoformas de APN y la expresión de mALP en la línea celular de insecto sf9, sugieren un

mecanismo complejo de interacción de Cry4Ba y Cry11Aa con las proteínas ancladas por GPI para efectuar su toxicidad en larvas de *A. aegypti*.

El silenciamiento de la expresión de ALP1 no modificó el efecto sinérgico de la toxicidad de Cyt1Aa y Cry11Aa. Además, este efecto sinérgico conferido por la adición de estas toxinas juntas, enmascara al fenotipo tolerante a la toxina Cry11Aa de las larvas silenciadas en la expresión de ALP1.

En conjunto, nuestros resultados muestran que ALP1 es un receptor importante de toxinas Cry y que está involucrado en la toxicidad de Cry11Aa y Cry4Ba. Sin embargo, hay que considerar la participación de otras moléculas ancladas por GPI que también pudieran estar involucradas en el modo de acción de estas toxinas.

9. PERSPECTIVAS

-Analizar el efecto sinérgico de Cyt1Aa con Cry4Ba en larvas que tienen silenciada la expresión de ALP1.

-Examinar el sinergismo entre Cyt1Aa y Cry11Aa/Cry4Ba usando VMMA's del intestino de larvas que tienen silenciada ALP1 y larvas control.

-Silenciar mediante dsRNA los receptores reportados para Cry4Ba y analizar su papel en la toxicidad de Cry11A.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Crickmore N., Zeigler D.R., Feiltelson J., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Dean D.H. (1998) **Revision of Nomenclature for *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins**. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(3): 807-813.
2. Angst, B.D., Marcozzi, C., and A. I. Magee. 2001. **The cadherin superfamily: diversity in form and function**. J. Cell Sci. 114:629-641
3. Boonserm P., Davis P., Ellar D. J., Li J. (2005). **Crystal structure of the Mosquito-larvicidal Toxin Cry4Ba and its Biological implications**. J. Mol. Biol. 348, 363-382.
4. Boonserm P., Mo M., Angsuthanasombat Ch, Lescar J. (2006). **Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Å resolution**. J. Bacteriol. 188, 3391-3401.
5. Li J., Carrol J., Ellar D. J. (1991). **Crystal structure of insecticidal δ -Endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution**. Nature 353, 815-821.
6. Li J., Koni P.A., Ellar D. J. (1996). **Structure of the Mosquitocidal δ -Endotoxin Cyt B from *Bacillus thuringiensis* sp. *Kyushuensis* and Implication for Membrane Pore Formation**. J. Mol. Biol. 257:129-152.
7. Hua, G., Zhang, R., Abdullah, M. A. and Adang, M. J. (2008) **Anopheles gambiae cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity**. Biochemistry 47, 5101–5110.
8. Fernández L.E., Aimanova K.G., Gill S.S., Bravo A., Soberón M. (2006). **A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa in *Aedes aegypti* larvae**. Biochem J. 394: 77-84.
9. Bravo A., Gómez I., Conde J., Muñoz-Garay C., Sánchez J., Miranda R., Zhuang M., Gill S.S., Soberón M. (2004). **Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains**. BB Acta. 1667: 38-46.
10. Bravo A. Soberón M. Gill S.S. (2007). **Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt Toxins and Their Potential for Insect Control**. Toxicon. 49(4):423-435.
11. Bravo A., Likitvivanavong S., Gill S.S., Soberón M. (2011). ***Bacillus thuringiensis*: A story of successful bioinsecticide**. Insect Biochem. Mo. Biol. 41, 423-431.
12. Gómez I., Pardo-López L., Muñoz-Garay C., Fernández L.E., Pérez C., Soberón M., Bravo A. (2007) **Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt**

- toxins produced by *Bacillus thuringiensis*.** Peptides. 28: 169-173.
13. Fernández L.E., Martínez-Anaya C., Lira E., Jianwu C., Evans A. Hernández-Martínez S., Lanz-Mendoza H., Bravo A., Gill S.S., Soberón M. (2009) **Cloning and epitope mapping of Cry11Aa-Receptor Alkaline Phosphatase from *Aedes aegypti*.** Biochemistry 48, 8899-8907.
 14. Chen, J., Brown, M.R., Hua, G. and Adang, M.J. (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.
 15. Chen J., Aimanova G., Fernández L.E., Bravo A., Soberón M., Gill S.S. (2009a) ***Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.** Biochemistry J. 424, 191-200.
 16. Chen J., Aimanova G., Pan S., Gill S.S. (2009b) **Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11Aa toxin.** Insect Biochem and Mol Biology. 39, 688-696.
 17. Cancino-Rodeno A., Alexander C., Villaseñor R., Pacheco S., Porta H., Pauchet Y., Soberón M., Gill S.S., Bravo A. (2010) **The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*.** Insect Biochem and Mol Biology. 40, 58-63.
 18. Harrington L.C., Edman J. D., Scott T.W. (2001). **Why Do Female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Feed Preferentially and Frequently on Human Blood?.** J. Med. Entomol. 38(3): 411-422.
 19. McNall R.J., Adang M. J. (2003). **Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Binding Proteins in *Manduca sexta* Midgut through Proteomic Analysis.** Insect. Biochem, Molec. Biol. 33:990-1010.
 20. Morse R.J., Yamamoto T., Stroud R.M. (2001). **Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope.** Structure. 9, 409-417.
 21. Galitsky N., Cody V., Wojtczak A., Ghosh D., Luft J.R., Pangborn W., English L. (2001). **Structure of insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Ba1 of *Bacillus thuringiensis*.** Acta Cryst. D57, 1101-1109.
 22. Parker M. W., Feil S.C., (2005). **Pore-Forming Protein Toxins: from Structure to Function.** Progr Biophys Mol. Biol. 88:91-142.
 23. De Maagd R.A., Bravo A., Crickmore N. (2001). **How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect World.** Trends in Genetics. 17, 193-199.

24. De Maagd R.A., Bravo A., Crickmore N., Schnepf H.E. (2003). **Structure, Diversity, and evolution of proteín toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria.** *Annu Rev Genet.* 37:409-33.
25. Pacheco S., Gómez I., Arenas I., Saab-Rincon G., Rodríguez-Almazán C., Gill S.S., Bravo A., Soberón M. (2009). **Domain II Loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin is Involved in a “Ping-Pong” binding Mechanism with *Manduca sexta* Aminopeptidasa-N y Cadherin Receptors.** *J Biol Chem*, 284(47): 32750-32757.
26. Fernández L.E., Pérez C., Segovia L., Rodríguez M.H., Gill S.S., Bravo A., Soberón M. (2005). **Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop α -8 of domain II.** *FEBS Lett*, 579: 3508-3514.
27. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. (1998). **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature* 391, 806-811.
28. Siomi H., Siomi M.C. (2009). **On the road to reading the RNA interference code.** *Nature* 457, 396-404.
29. Tomari Y., Zamore P.D. (2005). **Machines for RNAi.** *Genes and Development* 19, 517-529.
30. Cheong H., Gill S.S. (2003). **Cloning and characterization of a Cytolytic and Mosquitocidal δ -Endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*.** *Applied and Environmental Microbiology.* 63:3254-3260.
31. Lee Y., Kim M., Han J.J. Yeom K.H., Lee S., Baek S.H., Kim V.N. (2004). **MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.** *EMBO Journal* 23, 4051-4060.
32. Cantón P.E., Reyes E.Z., Ruiz I., Bravo a., Soberón M. (2011). **Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* Cry4Ba to Cy1Aa has an important role in synergism.** *Peptides* 32, 595-600.
33. Pérez C., Fernández L.E., Sun J., Folch J.L., Gill S.S., Soberón M., Bravo A. (2005). ***Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 18303-18308.
34. Pérez C., Muñoz-Garay C.C., Portugal L., Sánchez J., Gill S.S., Soberón M., Bravo A. (2007). ***Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure.** *Cell. Microbiol.* 9, 2931-2937.
35. Likivitanavong S., Chen J., Evans A.M., Bravo A., Soberón M. (2011) **Multiple Receptors**

- as targets of Cry toxins in Mosquitoes.** J Agric. Food Chem. 509, 2829-2838.
36. Lallès J.P. (2010). **Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet.** Nutrition Reviews. 68(6):323-332
 37. Bravo A, Gill SS, Soberón M. (2005). **Bacillus thuringiensis Mechanisms and Use.** Comprehensive Molecular Insect Science. Elsevier BV pp. 175–206.
 38. Burton, S.L., Ellar, D.J., Li, J., Derbyshire, D.J., 1999. **N-acetilgalactosamina 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.
 39. Saengwiman, S., Aroonkesorn, A., Dedvisitsakul, P., Sakdee, S., Leetachewa, S., Angsuthanasombat, Pootanakit, K., 2011. **In vivo identification of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptors by RNA interference knockdown of glycosylphosphatidylinositol-linked aminopeptidase N transcripts in *Aedes aegypti* larvae.** Biochem and Biophys Res Communications. 407. 708-713.
 40. Dechklar, M., Tiewisiri, K., Angsuthanasombat, C., Pootanakit, K., 2011. **Functional expression in insects cells of glycosylphosphatidylinositol-linked alkaline phosphatase from *Aedes aegypti* larval midgut: A *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptor.** Insect Biochem and Mol Bio. 41. 159-166.
 41. Grouchulski P., Masson L., Borisova S., Pusztai-Carey M., Schwartz J.L., Brousseau R., Cygler M. (1995). ***Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation.** J. Mol. Biol. 254, 447-464.
 42. Guo S., Ye S., Liu Y., Wei L., Xue J., Wu H., Song F., Zhang J., Wu X., Huang D., Rao Z. (2009). **Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*.** J. Struct. Biol. 168, 259.
 43. Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, I., Ji, T. H. and Bulla, L. A. Jr. (1995). **Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*.** J. Biol. Chem. 270, 5490-5494.
 44. Luo K., Lu Y.J., Adang M.J. (1996). **A 106 kDa Form of Aminopeptidase is a Receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIC δ -Endotoxin in the Brush Border Membrane of *Manduca sexta*.** Insect. Biochem, Molec. Biol. 26: 783-791.
 45. Nagamatsu, Y., Toda, S., Koike, T., Miyoshi, Y., Shigematsu, S. and Kogure, M. (1998). **Cloning, sequencing and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Aa toxin.** Biosci. Biotechnol. Biochem. 62:727-734.

46. Gahan L. J., Gould, F. and Heckel, D.G. (2001). **Identification of a gene associated with *Bacillus thuringiensis* resistance in *Heliothis virescens*.** Science. 293: 857-860.
47. Morin, S., Biggs, R. W., Shriver, L., Eilers-Kirk, C., Higginson, D., Holley, D., Gahan, Heckel, D.G., Carriere, Y., Dennehy, T.J., Brown, J.K. and Tabashnik, B.E.(2003) **Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm.** Proc. Nat. Acad. Sci. 100: 5004-5009.
48. Xu, X., Yu, L. and Wu, Y. (2005). **Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*.** Appl. Environ. Microbiol. 71, 948-954.
49. Flannagan, R.D., Yu, C. G., Mathis, J.P., Meyer, T. E., Shi, X., Siqueira, H.A. and Siegfried, B.D. (2005). **Identification, cloning and expression of a Cry1Ab cadherin receptor from European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera, Crambidae).** Insect Biochem. Mol. Biol. 35: 33-40.
50. Masson. L., Lu Y., Mazza A., Brousseau R., Adang M. (1995). **The Cry1Ac Receptor Purified from *Manduca sexta* Displays Multiple Specificities.** J. Biol. Chem. 270(35): 20309-20315.
51. Wang, P., X. Zhang, and J. Zhang. J. (2005). **Molecular characterization of four midgut aminopeptidase N isozymes from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*.** Insect Biochem. Mol. Biol. 35: 611-620.
52. Jurat-Fuentes J.L., Adang M.J. (2004). **Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae.** Eur. J. Biochem. 271:3127-35.
53. Wu D., Johnson J.J., Federeci B.A. (1994). **Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIV proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*.** Mol Microbiol. 13:965-972.
54. Wirth M.C., Georghiou G.P., Federeci B.A. (1997). **CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*.** Proc Natl Acad Sci USA. 94:10536-10540.
55. Zhang S., Cheng H., Gao Y., Wang G., Liang G., Wu K. (2009) **Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin.** Insect Biochem. Mol. Biol. 39, 421-429.



Aedes aegypti alkaline phosphatase ALP1 is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins

Alan I. Jiménez^{a,1}, Esmeralda Z. Reyes^{a,1}, Angeles Cancino-Rodezno^a, Leidy P. Bedoya-Pérez^a, Gustavo G. Caballero-Flores^a, Luis F. Muriel-Millan^a, Supaporn Likitvivanavong^b, Sarjeet S. Gill^b, Alejandra Bravo^a, Mario Soberón^{a,*}

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

^b Department of Cell Biology and Neuroscience, University of California, Riverside, CA 92506, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 March 2012

Received in revised form

31 May 2012

Accepted 4 June 2012

Keywords:

Bacillus thuringiensis

Cry toxins

Receptors

Alkaline phosphatase

RNA silencing

Aedes aegypti

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis subs. *israelensis* produces at least three Cry toxins (Cry4Aa, Cry4Ba, and Cry11Aa) that are active against *Aedes aegypti* larvae. Previous work characterized a GPI-anchored alkaline phosphatase (ALP1) as a Cry11Aa binding molecule from the gut of *A. aegypti* larvae. We show here that Cry4Ba binds ALP1, and that the binding and toxicity of Cry4Ba mutants located in loop 2 of domain II is correlated. Also, we analyzed the contribution of ALP1 toward the toxicity of Cry4Ba and Cry11Aa toxins by silencing the expression of this protein through RNAi. Efficient silencing of ALP1 was demonstrated by real-time quantitative PCR (qPCR) and Western blot. ALP1 silenced larvae showed tolerance to both Cry4Ba and Cry11Aa although the silenced larvae were more tolerant to Cry11Aa in comparison to Cry4Ba. Our results demonstrate that ALP1 is a functional receptor that plays an important role in the toxicity of the Cry4Ba and Cry11Aa proteins.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Bacillus thuringiensis subs. *israelensis* (Bti) is effective for controlling mosquito vectors of human diseases like certain *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* species (Bravo et al., 2007, 2011). During the sporulation phase, Bti produce crystal inclusions composed of a number of proteins, including the Cry11Aa, Cry10Aa, Cry4Aa and Cry4Ba Cry toxins that belong to the three-domain (3D) family of Cry proteins and two cytolytic Cyt toxin, Cyt1Aa and Cyt2Ba, all of which are active against mosquito larvae or are cytolytic (Bravo et al., 2007, 2011; Nisnevitch et al., 2006).

Different members of the 3D Cry toxin family show toxicity to a variety of insect species belonging to a number of insect orders. Domain I is a seven α -helix bundle involved in membrane insertion, toxin oligomerization and pore formation. Domain II is a β -prism of three anti-parallel β -sheets packed around a hydrophobic core with exposed loop regions, and domain III is a β -sandwich of two anti-parallel β -sheets; both domains are involved in midgut protein

recognition (Bravo et al., 2007). In the case of Cry4Ba toxin, mutagenesis studies have shown that domain II loop 2 region is important for *Aedes aegypti* toxicity (Khaokhiew et al., 2009).

A number of Cry toxin binding molecules have been described in the insect midgut and these have been shown to be involved in Cry toxicity (Pigott and Ellar, 2007). Among them are glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored aminopeptidases (APN), alkaline phosphatases (ALP) and transmembrane cadherins (Gahan et al., 2001; Fernández et al., 2006; Hua et al., 2008; Chen et al., 2009a, 2009b; Arenas et al., 2010; Fabrick et al., 2009). Recently Jurat-Fuentes et al. (2011) showed that lepidopteran colonies resistant to Cry1 toxins have diminished ALP activity and expression of ALP in their gut, indicating an important role of this Cry-binding protein in the mode of action of Cry1 toxins. It has been proposed that Cry toxins undergo a sequential binding mechanism with GPI-anchored proteins and cadherin with subsequent oligomerization of the Cry toxin to form pre-pore oligomers that insert into the membrane of the insect midgut epithelium cells bursting them by osmotic cell lysis (Bravo et al., 2004; Pacheco et al., 2009).

In the case of the dipteran *A. aegypti*, similar Cry toxin-binding midgut proteins, including, cadherin, APN and ALP, have been identified (Likitvivanavong et al., 2011). A GPI-anchored ALP

* Corresponding author.

E-mail address: mario@ibt.unam.mx (M. Soberón).

¹ Both authors contributed equally to this work.

isoform (ALP1) was shown to be functionally involved in Cry11Aa binding and toxicity to *A. aegypti* larvae (Fernández et al., 2006, 2009). Additionally, it was recently reported that expression of a different *A. aegypti* GPI-anchored ALP isoform (mALP) in insect cells resulted in Cry4Ba binding to transfected cells and susceptibility to this toxin (Dechklar et al., 2011). Finally, three APN isoforms were shown to be involved in the toxicity of Cry4Ba in *A. aegypti* by gene silencing with dsRNA (Saengwiman et al., 2011). One of these APN isoforms was previously characterized as a Cry11Aa binding molecule (Chen et al., 2009b).

In this work we analyzed the role of ALP1 in Cry4Ba toxicity by characterizing Cry4Ba loop 2 mutants affected in ALP1 binding and also by analyzing the toxicity of Cry4Ba to *A. aegypti* larvae silenced of the ALP1 gene. Our data indicates that ALP1 is a functional receptor of Cry4Ba.

2. Materials and methods

2.1. Growth of *Bacillus thuringiensis* (Bt), purification of Cry4Ba and Cry11Aa crystal inclusions and toxin activation

For the production of Cry4Ba and Cry11Aa crystal inclusions, acrySTALLIFEROUS Bt strain Q2-81 containing plasmid pHT618 (Delecluse et al., 1993) or pGC6 (Chang et al., 1993) respectively, were cultured for 3 days at 29 °C and 200 rpm in nutrient broth sporulation medium supplemented with erythromycin (10 µg/ml) (Lereclus et al., 1995). Spores and crystals produced by the Bt strains were harvested and washed three times with 0.3 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 8.0. For Cry4Ba activation, the crystals from the spore crystal mixture were solubilized in carbonate buffer (sodium bicarbonate/carbonate 0.1 M, pH 10.5) supplemented with 0.1% dithiothreitol, and activated with 1:20 w/w trypsin (Sigma–Aldrich Co.), for 16 h at 37 °C. Cry11Aa toxin was not solubilized since it was only used for determining insecticidal activity using spore crystals.

2.2. Site directed mutagenesis of the cry4Ba gene

Mutagenesis of the cry4Ba gene cloned in the pHT618 plasmid (Delecluse et al., 1993) was performed using a QuikChange XL-kit (Stratagene, La Jolla CA). Appropriate oligonucleotides were synthesized for each mutant construction. Mutants were sequenced and transformed into acrySTALLIFEROUS Bt strain 407 (Lereclus et al., 1989). Cry4Ba mutant toxins were purified and activated as described above.

2.3. Expression of ALP1

The *E. coli* strain ER2566 transformed with pET-32b plasmid containing *alp1* gene was previously described (Fernández et al., 2009). This strain produced ALP1 as an N-terminally His-tagged protein fused with thioredoxin. For protein expression, the ALP1 gene construct was induced by addition of 1 mM isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG) and protein was recovered as an inclusion body. The recombinant protein was purified using Ni-NTA resin (Qiagen) in the presence of 8 M Urea, dialyzed against PBS buffer and then analyzed by SDS-PAGE before use.

2.4. Preparation of Brush Border Membrane Vesicles (BBMV)

BBMV were prepared from dissected midguts of fourth instar *A. aegypti* larvae by differential precipitation using MgCl₂ as previously reported (Nielsen-LeRoux and Charles, 1992), and stored at –70 °C until used.

2.5. Qualitative assays of Cry4Ba binding to BBMV

Binding of Cry4Ba or Cry4Ba mutants was performed in 100 µl binding buffer (1× PBS, 0.1% BSA, 0.1% Tween 20 pH 7.6). After incubation of 10 nM toxin with 10 µg *A. aegypti* BBMV for 1 h at 25 °C, unbound toxin was removed by centrifugation (10 min at 14,000 × g). The membrane pellet with bound toxin was washed twice with 100 µl binding buffer and suspended in 1× PBS pH 7.6. An equal volume of 2× sample loading buffer (0.125 M Tris–HCl pH6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue) was added, samples were boiled for 3 min, separated by SDS-PAGE (10%), and electrotransferred to nitrocellulose membranes. The bound toxin was visualized by Western blot using anti-Cry4Ba polyclonal antibody (1:100,000 dilution) followed goat anti-rabbit secondary antibody coupled with horseradish peroxidase (Amersham) (1:5000 dilution) for 1 h. Finally, the blot was revealed by incubation with luminol (Pierce, Rockford, IL) as described by the manufacturer. Binding was quantified by scanning optical density of the 46 kDa Cry4Ba band in the blot.

2.6. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

To determine the Cry4Ba binding to ALP1, ELISA 96-well plates (Costar, NY) were incubated for 12 h at 4 °C with 2.5 µg of ALP1 in NaHCO₃ pH 9.6, followed by five washes with PBS, 0.2% Tween 20. The plates were then blocked by incubation with PBS, 0.5% gelatin (BioRad) 0.2% Tween 20, for 1 h at 37 °C and washed five times with buffer A (PBS, 0.1% Tween 20). The ELISA plates were then incubated with different concentrations of Cry4Ba for 2 h at 37 °C and washed again with buffer A. Cry4Ba that bound ALP1 was revealed with a 1:10,000 dilution of polyclonal anti-Cry4Ba antibody for 1 h and washed three times with buffer A followed by incubation with 1:10,000 dilution of anti-rabbit antibody (Santa Cruz) for one hour and washed three times. Finally, plates were incubated with 2 mM o-phenylene-diamine, 0.7% H₂O₂ in 0.1 M Na₂HPO₄ pH 5. The enzymatic reaction was stopped with 6 N HCl and absorbance read at 490 nm with a microplate reader from Molecular Devices (Sunnyvale, CA). Alternatively the binding of ALP1 to Cry4Ba and mutants was analyzed by incubating ELISA 96-well plates with 2.5 µg of Cry4Ba or Cry4Ba mutants as described above. The ELISA plates were then incubated with 50 nM of ALP1 recombinant protein and ALP1 that bound Cry4Ba was revealed with a 1:5000 dilution of anti-His antibody coupled to HRP (Qiagen) and treated as described above. ELISA was revealed as described above. As controls, wells coated with ALP1 but incubated without Cry4Ba or coated with Cry4Ba but incubated without ALP1 and revealed with the corresponding antibody were included in every ELISA. The absorbance of control, which was never greater than 0.1 OD, was subtracted from the experimental absorbance values.

2.7. Insect bioassays

An *A. aegypti* colony originally from CINVESTAV-Irapuato (CINVESTAV strain) was kept under laboratory conditions (Ibarra et al., 2003). To determine the mean lethal concentration (LC50) of Cry4Ba and loop 2 mutants, ten early fourth-instar *A. aegypti* larvae reared under 12:12 light:dark period were placed in 100 ml of de-chlorinated tap water (dechlorination was achieved by leaving tap water standing overnight). The effect of spore crystal suspension of Cry4Ba toxin and different mutants on mortality was analyzed after 24 h. Four replicates were used to obtain fiducial limits. The median lethal concentration (LC50) was calculated by Probit analysis using statistical parameters after four independent assays (Polo-PC LeOra Software). For dsRNA treated larvae, bioassays were performed using 20 larvae in 200 ml de-chlorinated tap

water, which contained individual spore crystal concentrations at the LC50 dose (100 ng/ml for Cry4Ba and 250 ng/ml for Cry11Aa). Larval mortality was analyzed after 24 h.

2.8. RNA interference (RNAi) assays

A 149 bp fragment of untranslated 3' end of the *A. aegypti* ALP1 gene was obtained using the sense and antisense primers and the cloned ALP1 gene as template (Fernández et al., 2009). 3' untranslated regions are highly divergent in conserved gene families. As control dsRNA lacZ fragment of 900 bp was amplified with appropriate primers. The fragment was cloned into pLitmus28i (HiScribe™, New England Biolabs, Beverly, MA) vector containing two T7 promoters flanking the multi-cloning site. These promoters enabled amplification of the cloned fragment by PCR using a T7 oligonucleotide. The PCR product was purified with QIAquick PCR purification kit protocol (Qiagen Valencia, CA). *In vitro* transcription of both DNA strands to yield dsRNA of the insert was performed with T7 RNA polymerase using the HiScribe RNAi Transcription Kit (New England Biolabs) as reported by the manufacturer.

RNAi experiments were performed as reported previously (Cancino-Rodezno et al., 2010). Two hundred neonate *A. aegypti* larvae in 10 ml of dechlorinated water were fed for 16 h with 200 µg of dsRNA previously encapsulated with Effectene transfection reagent as described by the manufacturer (Qiagen). The encapsulated dsRNA sample was diluted with dechlorinated water to a final volume of 10 ml. After dsRNA feeding the mosquito larvae were transferred to clean water and fed with regular diet until they reached early fourth instar for bioassays or for dissection of the gut. To quantify ALP1 transcript levels in dsRNA-treated and untreated larvae, total RNA was isolated from the dissected midguts and then reverse transcribed using oligo dT and SuperScript II (Invitrogen). For qPCR, we obtained the cDNA coding sequences of all *A. aegypti* ALP from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and made a multiple sequence alignment using Bioedit program (www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html). Two primers 969F20 (5'-CGATCTCACTTACGCCGCTA-3') and 1069R20 (5'-TCCAGG-GATTTCGAGCTTT-3') that amplified a 120 bp ALP1 region were used, while for mALP we designed two specific primers dsALPm-F (5'-GCGCACAAGGAGAACAACCGATCAAGG-3') and dsALPm-R (5'-ATGTCTGCTCTTCTCGCTCGGAGTGCCT-3') to amplify a 328 bp. RT-PCR was performed using total RNAs extracted from *A. aegypti* larval midgut using the following profile: 94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s with a final extension of 7 min at 72 °C. The resulting PCR products was cloned and sequenced showing the designed primers specifically amplified the ALP1 or mALP gene sequences indicating that the primers used were specific for each gene sequence. The level of rps3 mRNA (AAEL008192-RB), were used as internal control to normalize the results obtained for the ALP1 mRNA among the tested groups using primers Rps3 forward (5'-GGCATGTTCCGTGCTGAATTGAACG-3') and Rps3 reverse (5'-TTCTCGGCG TACAGCTCGACG 3'). qPCR was performed on a Light Cycler 480 II Instrument (Roche) using SYBER Green/Rox Master Mix (Fermentas). Amplification conditions were 10 min at 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s for a total of 40 cycles. The final primer concentration was 250 nM. All qPCR reactions were performed in triplicate for ALP1 and twice for mALP genes of each experimental group. A nontemplate control of each reaction was included in each reaction. The quantification technique used to analyze data was as reported (Livak and Schmittgen, 2001).

2.9. Western blot

For ALP detection 40 midguts from larvae treated with ALP1 dsRNA or LacZ dsRNA were dissected and homogenized in PBS

buffer containing 2 mM PMSF. The homogenate was centrifuged (5000 g) and the supernatant recovered to load gels. For two dimensional electrophoresis, midgut protein lysates were precipitated and cleaned using 2-D Clean up kit (Amersham, Biosciences) as described by the manufacturer and resuspended in rehydration electrofocusing buffer (0.8 M urea, 2% Chaps, 0.5% IPG buffer v/v pH 3–10, 0.002% bromophenol blue m/v). The protein concentration was determined by 2-D Quant (Amersham Biosciences). Seventy micrograms of protein in 125 µl of rehydration electrofocusing buffer were used to rehydrate overnight 18 cm immobilized pH gradient (IPG) strip (pH 3–11 non-linear, GE Life Sciences). First dimension electrofocusing was run on the IPGphor III (GE Life Sciences) with the following settings: step 1, 500 V, 30 min; step 2, 1000 V, 30 min; step 3, 5000 V, 1.5 h. Before the SDS-PAGE (second dimension), the IPG strip was reduced for 10 min with 65 mM of dithiothreitol in sodium dodecyl sulfate (SDS) equilibration buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.8], 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue), and then alkylated for 15 min with 135 mM of iodoacetamide in the same equilibration buffer. The second dimension SDS-PAGE was performed in an Ettan DALT Six system (GE Life Sciences), using 15% homogeneous acrylamide gels. Electrophoresis was performed using an initial step of 2 W/gel for 25 min followed by 17 W/gel until the dye front reached the bottom of the gel. Gels from two-dimensional electrophoresis were transferred onto nitrocellulose membranes. Proteins were detected with polyclonal anti-ALP1 (1/5000; 2 h) and a goat anti-rabbit secondary antibody coupled with horseradish peroxidase (Amersham) (1/10,000; 1 h), followed by Super Signal chemiluminescence substrate (Pierce) as indicated by the manufacturer. The anti-ALP1 antibody was previously obtained by producing a recombinant ALP1 protein in *E. coli* to use it to immunize rabbits (Fernández et al., 2009).

3. Results

3.1. Cry4Ba domain II loop 2 is involved in ALP1 binding

Since previous work showed that Cry11Aa and Cry4Ba bound ALP1, and that Cry11Aa mutants in domain II loop $\alpha 8$ or domain III $\beta 18$ – $\beta 19$ region affected ALP1 binding and toxicity to *A. aegypti* (Fernández et al., 2009) we decided to identify the Cry4Ba regions involved in ALP1 binding. Site directed mutagenesis of Cry4Ba domain II loop 2 revealed that this toxin region is important for toxicity to *A. aegypti* (Khaokhiew et al., 2009). The loop 2 region of domain II corresponds to residues 387SSPS390 (Boonserm et al., 2005). Four mutants were constructed in the domain II including loop 2 residues and some residues of $\beta 6$ and $\beta 7$ strands. These mutants were named B6M1 (ITD383-385AAA), L2M2 (TSS386-388AAA), L2M3 (PSN389-391AAA) and B7M4 (RVTK392-395AAAA). The four mutants were structurally stable since two bands of 46 and 18 kDa were obtained when they were proteolytically activated with trypsin as observed with wild-type Cry4Ba (Fig. S1). Bioassays with fourth instar *A. aegypti* larvae were performed to determine the median lethal concentration (LC50) of Cry4Ba and loop 2 mutants. The mutants L2M2, L2M3 and B7M4 showed two-, six- and ten-fold lower toxicity than Cry4Ba, respectively (Table 1), while for mutant B6M1, which had two-fold lower toxicity than Cry4Ba, the fiducial limits of the corresponding LC50 values overlap.

To analyze if these differences in toxicity result from changes in toxin binding qualitative binding analyses of activated Cry4Ba and domain II loop 2 mutants to *A. aegypti* BBMV were performed. Indeed the four Cry4Ba domain II loop 2 mutants showed 45–70% reduction in binding of the 46 kDa protein to BBMV in comparison to Cry4Ba (Fig. 1). To analyze the binding of the Cry4Ba loop 2

Table 1
Toxicity of Cry4Ba and its loop 2 mutants to *A. aegypti* fourth instar larvae.

Toxin	LC50 ^a (ng/ml)	LC50mut/LC50wt
Cry4Ba	79.4 (61.0–102.4) ^b	
B6M1 (ITD383-385AAA) ^d	114.9 (81.6–160.4)	1.4 ^c
L2M2 (TSS386-388AAA)	173.1 (105.1–282.9)	2.1
L2M3 (PSN389-391AAA)	455.9 (355.2–596.6)	5.7
B7M4 (RVTK392-395AAAA)	767.5 (678.2–861.8)	9.6

^a Fifty percent lethal concentration (LC50) of spore/crystal inclusions.

^b 95% fiducial limits.

^c Fiducial limits overlap.

^d Residues that were changed to alanine in each mutant.

mutants to ALP1 we first performed a binding saturation curve of Cry4Ba to purified ALP1 produced in *E. coli* cells by ELISA binding assay. Fig. 2A shows that Cry4Ba binds to ALP1 in a saturable way with apparent relative low binding affinity. Binding analysis of ALP1 to the Cry4Ba was performed by ELISA assays under non-saturating conditions confirmed that ALP1 has reduced binding to Cry4Ba mutants (Fig. 2B). In conditions where binding is analyzed under non saturated conditions a reduction in binding is likely to reflect a decreased in binding affinity. Moreover, the binding of ALP1 to Cry4Ba correlates with their toxicity levels, that is, B7M4 mutant that showed tenfold lower toxicity (Table 1) had ten-fold less binding to ALP1 (Fig. 2B). However, B6M1 mutant showed reduced toxicity and reduced binding to *A. aegypti* BBMV but had no significant effect on ALP1 binding.

3.2. Toxicity of Cry11Aa and Cry4Ba to *A. aegypti* ALP1-silenced larvae

The reduction in binding of Cry4Ba loop 2 mutants to ALP1 and in the toxicity of these mutants suggests that ALP1 is a functional receptor of this toxin. To validate the role of ALP1 in mediating

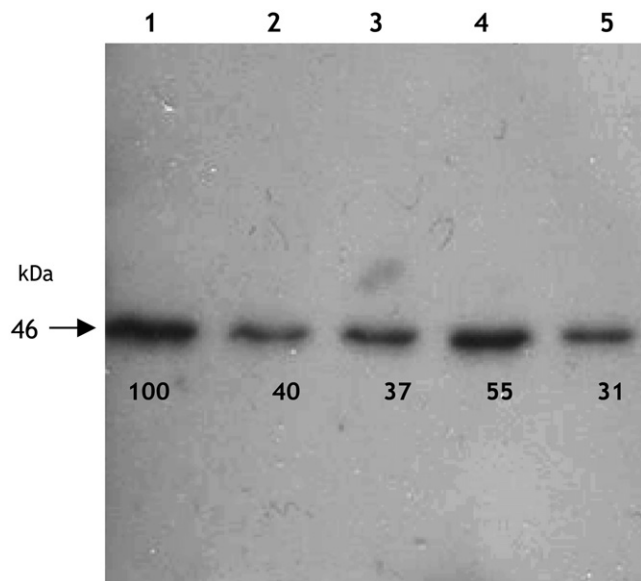


Fig. 1. Cry4Ba loop 2 mutants are affected on *A. aegypti* BBMV binding. Qualitative binding analysis of Cry4Ba (lane 1) and Cry4Ba mutants B6M1 (lane 2), L2M2 (lane 3), L2M3 (lane 4), and B7M4 (lane 5): Numbers below bands show the percentage of binding (normalized to Cry4Ba) obtained by scanning optical density of the 46 kDa toxin band.

Cry4Ba and Cry11Aa toxicity to *Aedes* larvae we decided to silence ALP1 expression using dsRNA interference. Screening of the *A. aegypti* genome using the mALP gene sequence, revealed 13 different ALP isoforms including ALP1 (Dechklar et al., 2011). Of these 13 ALP sequences at least eight are expressed in the insect midgut (Fernández et al., 2009; Dechklar et al., 2011; Bayyareddy et al., 2009; <http://funcgen.vectorbase.org/ExpressionData/>). In order to specifically silence the ALP1 isoform, a DNA fragment of 149 bp from the untranslated 3' region of the ALP1 transcript was cloned into a suitable vector for dsRNA synthesis as described in Materials and Methods. Unlike the open reading frames 3' untranslated regions are not conserved even for homologous transcripts.

Because efficient gene silencing in *A. aegypti* larvae can be obtained by feeding dsRNA molecules encapsulated in Effentene liposomes (Cancino-Rodezno et al., 2010), encapsulated ALP1 dsRNA was fed to first instar *A. aegypti* larvae. Fig. 3 shows that the ALP1 transcript levels were reduced three-fold in ALP1-silenced larvae in comparison to control larvae. We also analyzed the effect of ALP1 dsRNA on mALP transcript levels and show that the ALP1 RNAi did not affect the expression of mALP RNA (Fig. 3). However, Western blot did not reveal any effect of feeding ALP1 dsRNA at the protein level (data not shown). Since at least eight ALP isoforms have been shown to be expressed in the *A. aegypti* gut, we performed a Western blot from a two-dimension (2-D) gel electrophoresis of *A. aegypti* midguts (Fig. S2). Fig. 4A shows that the anti-ALP1 antibody recognized at least four proteins with similar molecular weights (65 kDa) but with different isoelectric points. Western blot analysis of 2-D gels of ALP1-silenced larvae showed that the less acidic isoform was reduced in comparison to the other three cross-reactive anti-ALP proteins (Fig. 4B). This agrees with the predicted PI for four ALP's, ALP1 (pH 6.8), ALP2 (pH 5.2), ALP3 (pH 6.1) and mALP (pH 5.8), although posttranslational modifications can contribute to the pIs of ALP isoforms. These results suggest that ALP1 was specifically silenced without affecting the expression of other ALP midgut isoforms.

ALP1-silenced larvae were exposed to an LC50 dose of either Cry11Aa or Cry4Ba and the toxicity was compared to that of control lacZ silenced or non-silenced larvae. Fig. 5 shows that ALP1-silenced larvae were more tolerant to both Cry11Aa and Cry4Ba toxins indicating that ALP1 has a functional role in the toxicity of both Cry toxins. However, ALP1-silenced larvae were more tolerant to Cry11Aa in comparison to Cry4Ba, since the silencing of ALP1 reduced the toxicity of Cry4Ba less than two-fold while a 4-fold reduction in Cry11Aa toxicity was observed (Fig. 5).

4. Discussion

We previously showed that ALP1 and a cadherin act as receptor proteins for the Cry11Aa toxin in *A. aegypti* larvae (Fernández et al., 2006, 2009; Chen et al., 2009a). More recently we also showed that Cry4Ba toxicity in this mosquito species is apparently not mediated by the cadherin molecule (Rodríguez-Almazán et al., 2012). Further our previous work (Fernández et al., 2009) provided preliminary evidence that ALP1 also binds Cry4Ba. Here we provide further evidence ALP1 indeed has as an important a role in mediating the toxicity of Cry4Ba to *Aedes* larvae.

In mosquito larvae in which ALP1 gene expression was attenuated using dsRNA-mediated gene silencing, the toxicity of Cry4Ba was two-fold lower than in controls (Fig. 5). As expected in these silenced mosquitoes Cry11Aa toxicity was decreased four-fold since previous data showed that Cry11Aa relies on ALP1 binding for toxicity (Fernández et al., 2006). Interestingly ALP1-silenced larvae become more tolerant to Cry11Aa than to Cry4Ba, suggesting that Cry11Aa relies more on ALP1 binding than does Cry4Ba. Further,

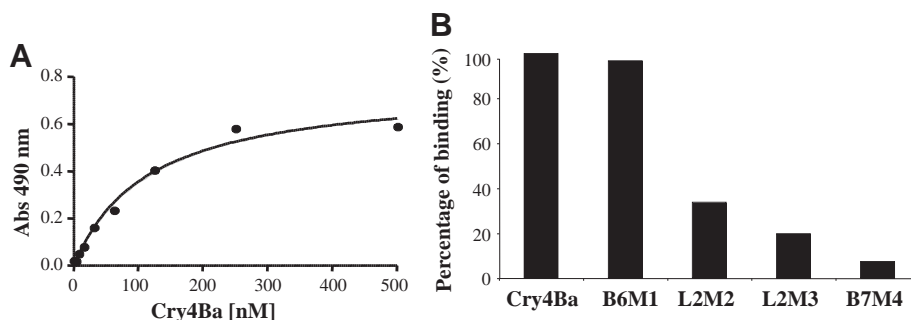


Fig. 2. Cry4Ba domain II loop 2 is involved in binding to ALP1. A. Cry4Ba binding to ALP1 analyzed by ELISA saturation binding assays. ELISA binding assay was performed by fixing 2.5 μ g of ALP1 in ELISA plates and incubating with different concentrations of Cry4Ba and revealing bound Cry4Ba with polyclonal anti-Cry4Ba antibody. B. ELISA binding assays of 2.5 μ g of Cry4Ba or loop 2 mutants to 50 nM ALP1. ELISA was revealed with anti-His antibody.

this decrease in toxicity was correlated with a decrease in ALP1 transcript levels but not that of a homologous ALP, mALP (Dechklar et al., 2011). Moreover, protein levels of ALP1 were also observed to decrease in ALP1 silenced mosquitoes.

To further analyze the role of ALP1 as a receptor of the Cry4Ba toxin, we characterized four Cry4Ba mutants located near or in loop 2 of domain II, since loop 2 was previously shown to be important for *A. aegypti* toxicity (Khaokhiew et al., 2009). All the mutants analyzed showed a decreased in toxicity. Our data also showed a correlation between the binding of Cry4Ba loop 2 mutants to the ALP1 receptor and toxicity (Fig. 3). The binding of loop 2 mutants to *A. aegypti* BBMV was also affected. These results suggest that the Cry4Ba protein relies on ALP1 binding to exert its toxic effect. Nevertheless, B6M1 mutant did not fit in this correlative effect since it showed reduced binding to BBMV, reduced toxicity but no significant effect on ALP1 binding. Also, since ALP1 silencing showed a moderate effect on Cry4Ba toxicity, it is possible that Cry4Ba mutations described here in addition affected Cry4Ba binding to other receptor proteins such as mALP. This remains to be determined.

Our results show that the GPI-anchored ALP1 is an important Cry toxin-binding molecule that is involved in Cry11Aa and Cry4Ba toxicity. In addition, it was previously shown that expression of a homologous ALP, mALP, in insect cells conferred susceptibility to

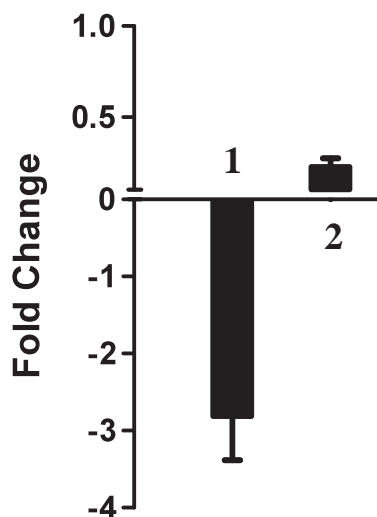


Fig. 3. ALP1 silenced *A. aegypti* larvae have reduced ALP1 transcript levels. qPCR analysis of ALP1 transcript (lane 1) or mALP (lane 2). ALP1 and mALP qPCR was performed from total RNA extracted from control (Effectene treated larvae) or ALP1 silenced larvae. ALP1 transcript levels are the average of three independent experiments, while those of mALP are from two independent experiments.

Cry4Ba (Dechklar et al., 2011). Both results support the view that ALP's are functional receptors for the Cry4Ba toxin.

Several other GPI-anchored proteins may also be involved in the mode of action of these toxins suggesting a complex binding mechanism of these toxins with GPI-anchored receptors to exert their toxicity to *A. aegypti* larvae. For example three *A. aegypti* APN isoforms were silenced and also resulted in a tolerant phenotype to Cry4Ba (Saengwiman et al., 2011). Nevertheless, it was shown that silencing one particular APN isoform (APN12783) conferred a stronger tolerant phenotype to Cry4Ba than the silencing of the two other APN isoforms, indicating that APN12783 has a predominant role in Cry4Ba toxicity (Saengwiman et al., 2011). It is surprising that three APN and two ALP isoforms are involved in Cry4Ba toxicity to *A. aegypti*. If all these GPI-anchored proteins fulfill the same role in Cry4Ba toxicity it should be expected that silencing one molecule should not result on a tolerant phenotype since the other GPI-anchored proteins should compensate for the absence of the silenced molecule. This could explain the moderate effect of silencing ALP1 on Cry4Ba toxicity. Nevertheless, it is possible that the different GPI-anchored molecules involved in Cry4Ba toxicity could be involved in different steps on the mode of action of this toxin.

It has been proposed that GPI-anchored proteins fulfill two roles – binding the monomeric toxin with low binding affinity to concentrate it in the microvilli membrane before the toxin binds to cadherin and also to bind with high affinity the pre-pore oligomer facilitating its insertion into the membrane (Pardo-López et al., 2006; Pacheco et al., 2009). Thus, it is possible that different GPI-anchored proteins identified could have differential roles on the mode of action of Cry4Ba. This remains to be determined by analyzing the binding affinities of the monomeric and oligomeric forms of Cry4Ba to pure GPI-anchored receptors. Alternatively, it is also possible that different GPI-anchored proteins could form a protein complex that functions as a Cry toxin receptor, thus silencing one GPI-anchored protein could affect the binding of Cry4Ba to this complex receptor. It is interesting to mention that GPI-anchored proteins are specifically localized in lipid rafts and disruption of lipid rafts by sequestering cholesterol with methyl- β -cyclodextrin was shown to inhibit Cry1A pore-formation (Zhuang et al., 2002). Thus the integrity of lipid rafts could be important to maintain a set of GPI-anchored proteins together as complex of proteins that function as receptor of Cry4Ba. It will be interesting to compare the effect of silencing of the three APN isoforms on Cry11Aa and Cry4Ba toxicity to *A. aegypti*.

Although we identify here an important role for ALP1 in Cry4Ba toxicity in *A. aegypti* it is important to cognize of the fact that in other mosquito species other proteins may be involved in toxicity. Clearly in *Anopheles gambiae* the Cry4Ba toxin targets the cadherin-like protein, which also synergizes its toxicity (Hua et al., 2008), and

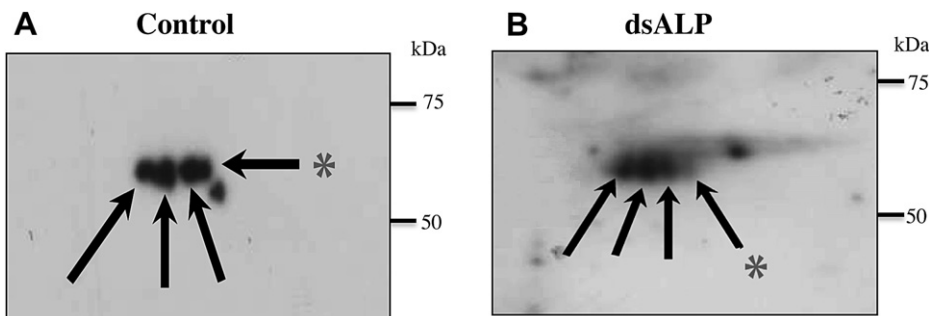


Fig. 4. ALP1 silenced larvae show reduced levels of one ALP isoform. Western blot analysis of ALP protein in two-dimensional electrophoresis from 70 µg of midgut protein from *A. aegypti* larvae. Arrows show four anti-ALP cross-reacting proteins, the asterisk show the ALP isoform that with reduced expression in ALP1 silenced larvae.

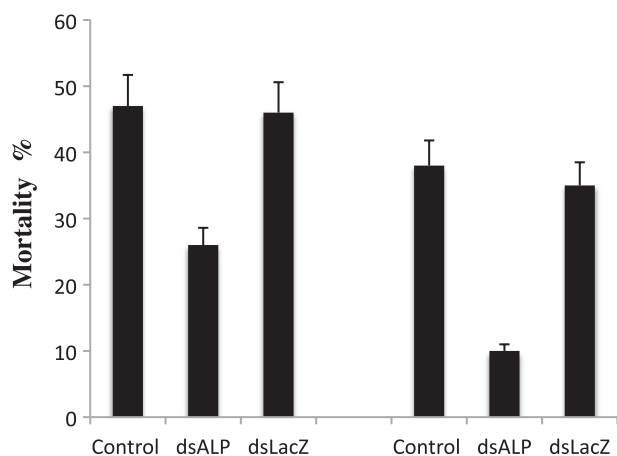


Fig. 5. ALP1 silenced larvae are more tolerant to Cry4Ba and Cry11Aa. Two hundred control, or ALP1 silenced (dsALP) or lacZ dsRNA treated (dsLacZ) larvae were exposed to Cry4Ba or Cry11Aa at the LC50 dose and mortality was recorded. Bars show average of three independent repetitions with standard deviations.

in *Anopheles albimanus* an α -amylase acts as a Cry4Ba receptor (Fernández-Luna et al., 2010).

Finally, it is essential to note that there is an even greater diversity of proteins involved in binding mosquitocidal toxins. The diversity is too extensive for a discussion here but can be assessed in recent reviews (Bravo et al., 2011; Likitvivanavong et al., 2011).

Acknowledgments

We thank Lizbeth Cabrera for technical assistance. Research was funded in part through grants from the National Institutes of Health [1R01 AI066014], DGAPA/UNAM [IN218608 and IN210208-N], CONACyT [81639] and UCR RSAP.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ibmb.2012.06.001.

References

Arenas, I., Bravo, A., Soberón, M., Gómez, 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.

Bayyareddy, K., Andacht, T.M., Abdullah, M.A., Adang, M.J., 2009. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut from *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 279–286.

Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D.J., Li, J., 2005. Crystal structure of the mosquito larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* 348, 363–382.

Bravo, A., Gomez, I., Conde, J., Munoz-Garay, C., Sanchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S.S., Soberón, M., 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. et Biophys. Acta* 1667, 38–46.

Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicol.* 49, 423–435.

Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S.S., Soberón, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 423–431.

Cancino-Rodezno, A., Alexander, C., Villaseñor, R., Pacheco, S., Porta, H., Pauchet, Y., Gill, S.S., Soberón, M., Bravo, A., 2010. The mitogen-activated protein kinase p38 pathway is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 58–63.

Chang, C., Yu, Y.M., Dai, S.M., Law, S.K., Gill, S.S., 1993. High-level cryIVD and cytA gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 815–821.

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

Chen, J., Aimanova, K.G., Pan, S., Gill, S.S., 2009b. Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11Aa toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 688–696.

Dechklar, M., Tiewisiri, K., Angsuthanasombat, C., Pootankit, K., 2011. 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.* 41, 159–166.

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

Fabríck, J., Oppert, C., Lorenzen, M.D., Morris, K., Oppert, B., Jurat-Fuentes, J.L., 2009. A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. *J. Biol. Chem.* 284, 18401–18410.

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

Fernández, L.E., Martínez-Anaya, C., Lira, E., Chen, J., Evans, J., Hernández-Martínez, S., Lanz-Mendoza, H., Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M., 2009. Cloning and epitope mapping of Cry11Aa-binding sites in the Cry11Aa-receptor alkaline phosphatase from *Aedes aegypti*. *Biochemistry* 48, 8899–8907.

Fernández-Luna, M.T., Lanz-Mendoza, H., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M., Miranda-Rios, J., 2010. 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.* 12, 746–757.

Gahan, L.J., Gould, F., Heckel, D.G., 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293, 857–860.

Hua, G., Zhang, R., Abdullah, M.A., Adang, M.J., 2008. *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. *Biochemistry* 47, 5101–5110.

Ibarra, J.E., del Rincón, M.C., Ordúz, S., Noriega, D., Benintende, G., Monnerat, R., Regis, L., de Oliveira, C.M., Lanz, H., Rodríguez, M.H., Sánchez, J., Peña, G., Bravo, A., 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5269–5274.

Jurat-Fuentes, J.L., Karumbaiah, L., Jakka, S.R., 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.

Khaokhiew, T., Angsuthanasombat, C., Promptmas, C., 2009. Correlative effect on the toxicity of three surface-exposed loops in the receptor-binding domain of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin. *FEMS Microbiol. Lett.* 300, 139–145.

- Lereclus, D., Arantes, O., Chaufaux, J., Lecadet, M.-M., 1989. Transformation and expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 60, 211–218.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M., Chaufaux, J., 1995. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* spo0A mutant. *Biotechnol.* 13, 67–71.
- Likitvivanavong, S., Chen, J., Evans, A.E., Bravo, A., Soberón, M., Gill, S.S., 2011. Multiple receptors as targets of Cry toxins in mosquitoes. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2829–2838.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C T}$ method. *Methods* 25, 402–408.
- Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 1992. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. *Eur. J. Biochem.* 210, 585–590.
- Nisnevitch, M., Cohen, S., Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Sofer, Y., Cahan, R., 2006. Cyt2Ba of *Bacillus thuringiensis*: activation by putative endogenous protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26, 99–105.
- Pacheco, S., Gomez, I., Arenas, I., Saab-Rincon, G., Rodriguez-Almazan, C., Gill, S.S., 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.
- Pardo-López, L., Gómez, I., Rausell, C., Sánchez, J., Soberón, M., Bravo, A., 2006. Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by *N*-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. *Biochemistry* 45, 10329–10336.
- Pigott, C.R., Ellar, D.J., 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 255–281.
- Rodríguez-Almazán, C., Reyes, E.Z., Zúñiga-Navarrete, F., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Evans, A.M., Likitvivanavong, S., Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M., 2012. Cadherin binding is not a limiting step for *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* Cry4Ba toxicity to *Aedes aegypti* larvae. *Biochem. J.* 443, 711–717.
- Saengwiman, S., Aroonkesorn, A., Dedvisitsakul, P., Sakdee, S., Leetachewa, S., Angsuthanasombat, C., Pootanakit, K., 2011. *In vivo* identification of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptors by RNA interference knockdown of glycosylphosphatidylinositol linked aminopeptidase N transcripts in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407, 708–713.
- Zhuang, M., Oltean, D.I., Gómez, I., Pullikuth, A.K., Soberón, M., Bravo, A., Gill, S.S., 2002. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J. Biol. Chem.* 277, 13863–13872.