



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LA TOXINA Cry3Aa CON UNA FOSFATASA
ALCALINA Y EL RECEPTOR CADERINA DEL INTESTINO DEL COLEÓPTERO
*Tenebrio molitor***

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. Fernando Zúñiga Navarrete

**TUTOR PRINCIPAL
Dr. Mario Soberón Chávez (IBT, UNAM)**

MIEMBROS DEL COMITE TUTOR

Dr. Ernesto Ortíz Suri (IBT, UNAM)

**Dr. Jesús Martínez Barnetche (Programa de
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas)**

MÉXICO D. F. SEPTIEMBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mi mamá Rufina Navarrete Rendón. Quien siempre ha sido el pilar fundamental de mi vida. Su amor y apoyo han sido las bases sobre las que me he construido. Sus consejos voluntarios e involuntarios han sido siempre una guía.
Mi principal motivación para seguir el camino.

A mi papá Fernando Zúñiga Valladares. El otro pilar fundamental de mi vida. A quien agradezco me haya permitido ser. Quien ha dejado que siga mi camino cualquiera que este sea.

A mis hermanos mayores Angel y Lucila. De quienes siempre he aprendido.

A mi sobrina Valentina. A quien le damos la bienvenida. Espero contribuir positivamente a lo que viene para ti.

A la Dra. Isabel Gómez Gómez. Por todo lo que ha hecho por mi formación profesional y personal. Ha sido un ejemplo a seguir y para perseguir la excelencia. La suya ha sido un aliciente para hacer el mayor esfuerzo.

A aquellos que tengo la fortuna de considerar amigos: Gabriela Pérez, Noé Durán, Edgar Demesa, Damaris Rodríguez, Edith Aparicio, Amado Demesa, Marco Salinas, Yvette López, Ramiro Gonzáles, Verna Cázares. Arlen Peña, Maricarmen Granados. Porque han estado ahí aunque no lo hayan notado.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Biotecnología, por la formación que en estas instituciones he obtenido.

Al Doctor Mario Soberón, por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo. Por dirigir mi tesis. Por haber fungido como guía científico en este proyecto. Por permitirme intentar mis ideas a pesar de no ser buenas. Por todo su apoyo sin el cual nada de esto habría sido posible.

A la Doctora Alejandra Bravo. Sus observaciones y críticas siempre han sido un aliciente para hacer el mejor trabajo posible.

A la Doctora Isabel Gómez. Por su guía científica durante el trabajo. Por la oportunidad de aprender de ella como perseguir la excelencia. Por todo el apoyo que me brindó al tratar de conseguir cada meta. Por ayudarme a aprender cómo superar mis limitaciones. Por el privilegio de su amistad.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Ernesto Ortiz Suri y Dr. Jesús Martínez Barnetche. Por sus aportaciones a la realización de este proyecto.

A los integrantes del jurado de examen de doctorado: Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva, Dra. Cinthia E. Núñez López, Dra. Alicia Gonzáles Manjarrez, Dr. Ricardo Alfredo Grande Cano, Dr. Pavel Isa.

A los compañeros del laboratorio: Biviana, Josué, Leivi, Arlen, Emiliano, Carlos, Zeferino, Jazmín, Diana. Por compartir este extraño viaje

A Jorge Sánchez por su apoyo con todo lo relacionado a las toxinas. Por todas las preguntas contestadas. A menudo más de una vez.

A Sergio Blancas por su apoyo logístico. Geles, medios, soluciones, bromas y todo lo necesario.

A Graciela Dominguez por todo el apoyo administrativo y por la asesoría en montones de trámites que habría sido infernalmente difícil hacer solo.

A los amigos de aquí y allá: Marco, Ivette, Damaris, Kenia, Gaby P. Noé D., Edgar, Edith, Amado, Alfredo, Iván, Ramiro, Verna, Xochitl. Por estar ahí de una u otra forma.

A los integrantes de la unidad de docencia del IBT: Jalil Saab, Gloria Villa y Antonio Bolaños. Por todo el apoyo todo tipo de tramites académicos. Sin ustedes nada se mueve.

A CONACYT por la beca de doctorado.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Mario Soberón Chávez del departamento de Microbiología Molecular en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Mario Soberón Chávez. Contó con el financiamiento del proyecto PAPIIT IN205411 y con la beca de doctorado otorgada por CONACYT a Fernando Zúñiga Navarrete.

“There are more things in heaven and earth, Horatio,
Than are dreamt of in our philosophy”.
- Hamlet (1.5.167-8), Hamlet to Horatio-

“It’s a strange world.
Let’s keep it that way”
-Elijah Snow, Jakita Wagner-
Planetary

“We’re all puppets Laurie.
I’m just a puppet who can see the strings”
-Watchmen, Dr. Manhattan to The Silk Spectre-

“Estudio de la interacción de la toxina Cry3Aa con una fosfatasa alcalina y el receptor caderina del intestino del coleóptero Tenebrio molitor”

ÍNDICE

Abreviaturas.....	2
Resumen.....	3
Abstract.....	4
Antecedentes generales.....	5-16
La bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i> y las toxinas Cry.....	5-9
Modelos del mecanismo de acción de las toxinas Cry.....	9-11
Receptores de las toxinas Cry.....	12-16
Antecedentes Particulares.....	17-22
La toxina Cry3Aa.....	17-21
Receptores de la toxina Cry3Aa.....	21-22
Hipótesis.....	23
Objetivos.....	23
Materiales y métodos.....	24-43
Resultados.....	44-71
La interacción entre la toxina Cry3Aa y VMMA de <i>T. molitor</i> es específica y dependiente de proteínas ancladas por GPI.....	44-48
En el intestino de <i>T. molitor</i> existen proteínas con actividad de fosfatasa alcalina ancladas por GPI.....	48-53
Obtención de herramientas para el estudio de la interacción de la toxina Cry3Aa con sus receptores.....	53-60
Análisis de la interacción de la toxina Cry3Aa y la mutante A1 con el anticuerpo V _{HH} A5 y el fragmento 12 de la caderina de <i>T. molitor</i>	61-71
Discusión.....	72-80
Conclusiones.....	81
Perspectivas.....	81
Bibliografía.....	82-89

ABREVIATURAS

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

dNTPs: Difosfato de deoxirribonucleótidos (deoxyribonucleotide diphosphate)

Taq Polimerasa: Polimerasa de *Thermus aquaticus*

LB: Caldo Luria (Luria broth)

x-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido

ADN: Ácido desoxirribonucleico

OPD: Orto fenil diamina

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción acoplado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

IgG: Inmunoglobulina G

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGTA: Ácido etilen glicol tetraacético

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

VMMA: Vesículas de la microvellosidad media apical.

RESUMEN

La bacteria *Bacillus thuringiensis* produce inclusiones cristalinas con actividad insecticida compuestas de toxinas Cry y Cyt, las cuales debido a su especificidad e inocuidad hacia organismos distintos a sus insectos blanco, se utilizan como bioinsecticidas.

La toxina Cry3Aa es activa contra insectos del orden de los coleópteros, sin embargo su utilización ha sido limitada debido a su baja toxicidad. A pesar de su potencial utilidad aún se conoce poco sobre su mecanismo de acción y solo se ha documentado la importancia de un receptor tipo caderina en experimentos *in vivo*.

En el presente trabajo se analizó el papel de una proteína tipo fosfatasa alcalina como posible receptor de la toxina Cry3Aa en el coleóptero *Tenebrio molitor*. Se demostró que es necesaria para la interacción de la toxina con las células intestinales de *T. molitor* y se sugiere que podría estar relacionada con la susceptibilidad de las larvas de este coleóptero a la toxina Cry3Aa.

A partir de una biblioteca de fragmentos variables de anticuerpos del camélido *Lama glama* desplegados en fagos, se aisló el anticuerpo V_{HH}A5 que se une al asa 1 de la toxina Cry3Aa. Se demostró que el anticuerpo V_{HH}A5 y el repetido 12 de la caderina de *T. molitor* (CR12), el cual se demostró es el sitio en la caderina de *T. molitor* con el que interacciona la toxina Cry3Aa, inhiben la interacción de la toxina Cry3Aa con vesículas de membranas de intestinos de *T. molitor*.

Se determinó que el anticuerpo V_{HH}A5 es tres veces más afín por la toxina mutante Cry3Aa A1 que por la toxina Cry3Aa. De manera similar, el CR12 de *T. molitor* es tres veces más afín por la toxina Cry3Aa A1 que por la toxina Cry3Aa. Ya que la toxina Cry3Aa A1 es 11 veces más tóxica contra *T. molitor*, los valores de afinidad indican que existe una relación entre la potencia tóxica de la toxina Cry3Aa y la afinidad por el receptor caderina.

Esta información podría ser útil para el diseño de nuevas versiones de toxinas con características deseadas como mayor toxicidad, contribuir a sustentar la teoría de la conservación del mecanismo de acción de las toxinas Cry y quizá con ello a un mejor entendimiento de este.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis produces crystal inclusions composed of Cry and Cyt toxins active against different insect species. Since Cry toxins are highly specific against their targets and harmless to other organisms, they have been used as biopesticides. Cry3Aa toxin is active against coleopteran insects, but its utilization has been limited due to its low toxicity. Another obstacle is that although the *in vivo* importance of a cadherin-like protein from the coleopteran *T. molitor* has been reported, most of the Cry3Aa toxin mode of action remains unknown.

In this work we analyzed the role of an alkaline phosphatase protein found in the *T. molitor* gut as a possible receptor for the Cry3Aa toxin, we shown that this protein is necessary for the Cry3Aa interaction with *T. molitor* gut cells and we suggest it could be related to the susceptibility of *T. molitor* larvae to Cry3Aa intoxication.

We also report the isolation through phage display, of a *Lama glama* antibody named V_{HH}A5 that binds to the loop 1 of Cry3Aa toxin domain II. V_{HH}A5 as well as the *T. molitor* cadherin repeat 12 (CR12), previously reported to be the site of interaction between the Cry3Aa toxin and the *T. molitor* cadherin, inhibited the interaction between the Cry3Aa toxin and *T. molitor* brush border membrane vesicles.

We determined that the V_{HH}A5 antibody affinity for the mutant toxin Cry3Aa A1 (R345A, Y350F, Y351F) is three fold higher than the V_{HH}A5 affinity for the wild type Cry3Aa toxin. Similarly, the *T. molitor* CR12 affinity for the the Cry3Aa A1 toxin is three fold higher than the CR12 affinity for the wild type Cry3Aa toxin. Since A1 toxin is 11 fold more toxic to *T. molitor* than Cry3Aa toxin, the affinity values point to a relationship between toxicity and the binding affinity of the Cry3Aa toxin for the cadherin receptor. This information could be useful in the design of new toxins with increased toxicity and might help to sustain the theory of a widely shared mechanism of action among Cry toxins.

ANTECEDENTES GENERALES

La bacteria *Bacillus thuringiensis* y las toxinas Cry

Bacillus thuringiensis es una bacteria aerobia gram-positiva formadora de esporas que puede encontrarse en gran variedad de hábitats (Figura 1). Se han aislado cepas de *B. thuringiensis* de suelos (Delucca A. J. *et al.*, 1979), cadáveres de insectos (Dulmage H. T., 1970) y granos almacenados (Delucca A. J. *et al.*, 1984; Meadows M. P. *et al.*, 1992). La bacteria forma inclusiones parasporales de proteínas usualmente durante la fase estacionaria de crecimiento, salvo por algunas excepciones en las que la producción comienza de forma temprana en las últimas fases del crecimiento logarítmico (Sekar V., 1988). Las inclusiones tienen propiedades insecticidas (Figura 1)

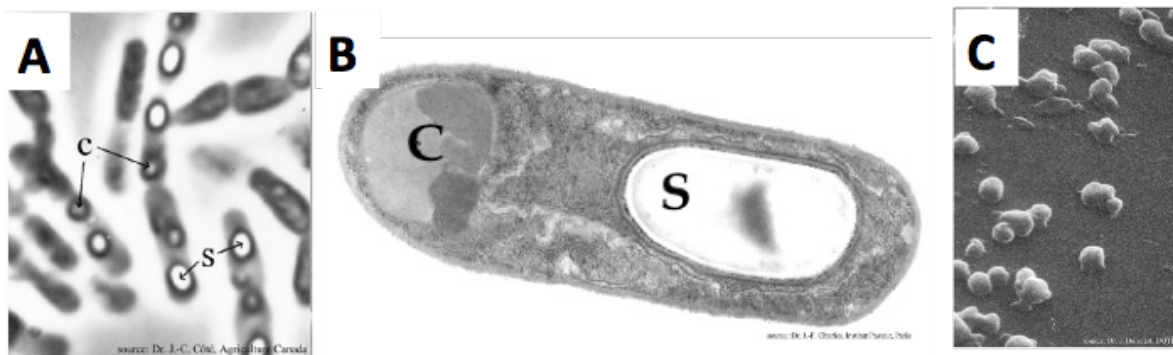


Figura 1. *Bacillus thuringiensis*, sus esporas y cristales. Fotografías de Bt var. *israelensis* que muestran: A) Células vegetativas fotografiadas mediante microscopía de luz. B) Célula fotografiada mediante microscopía electrónica de transmisión y C) Cristales producidos por Bt. S=espora, c=cristal (de Lacoursière J. O. y Boisvert, J., 2004).

Las inclusiones están compuestas de proteínas denominadas toxinas Cry debido a su estructura cristalina. La bacteria *B. thuringiensis* también produce β -exotoxinas, compuestos antibióticos (Schnepf E. *et al.*, 1998), toxinas VIP (toxinas secretadas en la etapa vegetativa) (Yu C. G. *et al.*, 1997) y toxinas Cyt (Waalwijk C. *et al.*, 1985) pero las toxinas Cry son las más prominentes y las mejor estudiadas. El tamaño del genoma de las cepas de *B. thuringiensis* es de entre 5 y 6 millones de pares de bases (Carlson C. R. y Kolsto, A. B., 1993), sin embargo los genes que codifican a las toxinas Cry se encuentran en plásmidos (Gonzalez J. M., Jr. *et al.*, 1981). La producción de las toxinas Cry a partir de estos plásmidos es un proceso bien regulado a nivel de transcripción por la activación sucesiva de factores sigma (Brown K. L. y Whiteley, H. R., 1988; Brown K. L. y Whiteley, H. R., 1990). También está regulado a nivel de transcripción ya que el RNAm de las toxinas Cry es muy estable. El RNAm de las toxinas Cry tiene una vida media de aproximadamente 10 minutos, lo que es al menos 5 veces mayor que un RNA mensajero bacteriano típico (Glatron M. F. y Rapoport, G., 1972). La regulación también podría considerarse a nivel postraducciona l ya que la capacidad de las toxinas para formar inclusiones cristalinas las protege de la degradación proteolítica prematura (Schnepf E. *et al.*, 1998).

Las diferentes cepas de *B. thuringiensis* usualmente producen mezclas de toxinas y la forma de los cristales depende de que tipos de toxinas los compongan. Los cristales pueden ser de forma bipiramidal (Cry1), cuboidal (Cry2), rectangular plano (Cry3) ó sin forma definida.

Las toxinas Cry se clasifican por su secuencias de aminoácidos. Se han reportado mas de 500 secuencias diferentes de genes *cry* clasificadas en 72 grupos (Cry1-Cry70) (Crickmore N. *et al.*, http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html).

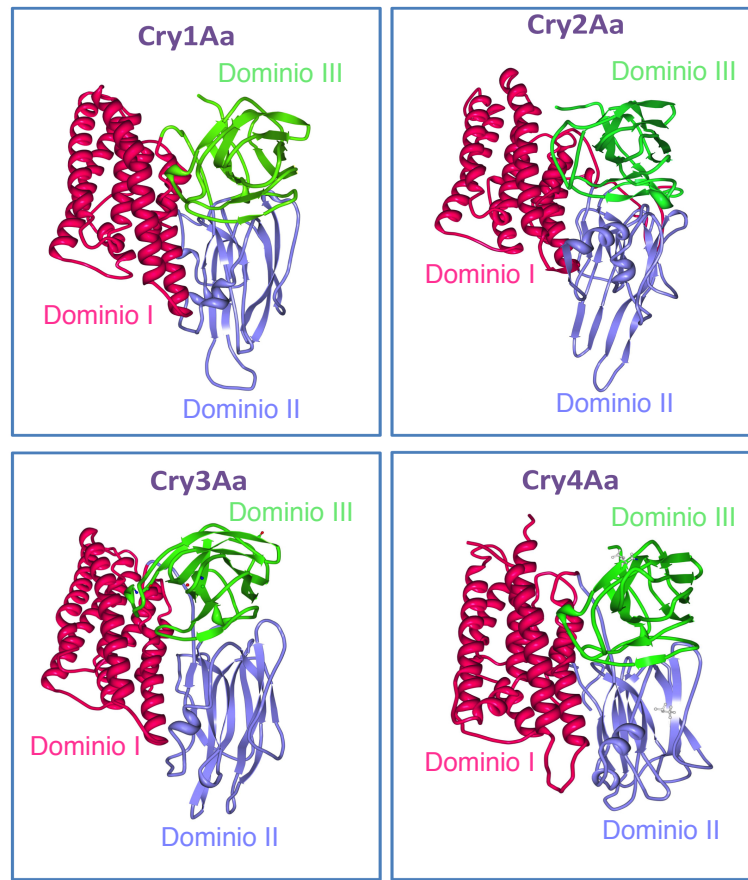


Figura 2. La estructura de las toxinas Cry está altamente conservada. Se muestran las estructuras de cuatro toxinas Cry con diferente especificidad y estructura similar: la toxina Cry1Aa (PDB: 1CIY) es específica contra insectos lepidópteros, la toxina Cry2Aa tiene actividad dual contra insectos dípteros y lepidópteros (PDB: 1I5P), la toxina Cry3Aa (PDB: 1DLC) es específica contra insectos coleópteros y la toxina Cry4Aa (PDB: 1I5P) es específica contra insectos dípteros. Se muestran los dominios con diferentes colores. El dominio I en rojo, el dominio II en violeta y el dominio III en verde. Las estructuras fueron modeladas a partir las secuencias del PDB (Protein Data Bank) utilizando el programa PDB Protein Workshop 3.9 (Moreland J. L. *et al.*, 2005).

Los genes *cry* se dividen en cuatro familias de proteínas no relacionadas filogenéticamente: la familia de las toxinas de tres dominios (3D), la familia de toxinas Cry mosquitocidas (Mtx), la familia de las toxinas binarias (bin-like "Bin") y la familia de las toxinas Cyt (de Maagd R. A. *et al.*, 2003).

La familia Cry de la que más ejemplos se conocen es la familia de las toxinas Cry de tres dominios (3D). Se han resuelto las estructuras tridimensionales de ocho toxinas Cry: Cry3Aa, Cry1Aa, Cry3Bb, Cry2Aa, Cry4Ba, Cry4Aa, Cry8Ea y Cry5B (Li J. D. *et al.*, 1991; Grochulski P. *et al.*, 1995; Galitsky N. *et al.*, 2001; Morse R. J. *et al.*, 2001; Boonserm P. *et al.*, 2006; Guo S. *et al.*, 2009; Hui F. *et al.*, 2012).

El dominio I está formado por siete hélices α (α -1, α -2, α -3, α -4, α -5, α -6, α -7). La hélice α -5 es la más hidrofóbica y está rodeada por las otras seis. En conjunto el dominio I tiene propiedades hidrofóbicas y anfipáticas. El plegamiento del dominio I es similar a los dominios que forman poros de otras toxinas como la colicina A, la toxina diftérica ó la exotoxina A de *Pseudomonas* (Li J. D. *et al.*, 1991; Schnepf E. *et al.*, 1998). Debido a esta similitud se propuso que el dominio I es el responsable de la formación de canales en membranas lipídicas. Esta teoría se confirmó utilizando mutantes en la hélice α -5 de la toxina Cry1Ac. Dichas mutantes se unen a vesículas producidas a partir de membranas de intestinos de larvas de *Manduca sexta*, pero no son tóxicas porque las mutaciones afectan su capacidad de formación de poro (Wu D. y Aronson, A. I., 1992).

El dominio II consiste de tres hojas β antiparalelas empacadas alrededor de un centro hidrofóbico. La asas expuestas del dominio II son similares a las regiones con las que las inmunoglobulinas se unen a sus antígenos (Li J. D. *et al.*, 1991). Los experimentos con toxinas mutantes del dominio II relacionan a este dominio con la especificidad de las toxinas. Una toxina Cry1Ab con mutaciones en el dominio II pierde capacidad de unión a membranas de intestinos de *M. sexta* y de *Heliothis virescens* (Rajamohan F. *et al.*, 1996). Por otra parte, una toxina Cry3Aa con mutaciones en el dominio II pierde actividad contra *Tenebrio molitor* (Wu S. J. y Dean, D. H., 1996). También se demostró que el dominio II ayuda a modular la toxicidad y especificidad de la toxina Cry1C (Smith G. P. y Ellar, D. J., 1994).

El dominio III está formado de hojas β antiparalelas. Inicialmente se propuso que su función era proteger a las toxinas de la acción de las proteasas (Li J. D. *et al.*, 1991). Sin embargo, mutaciones en el dominio III de la toxina Cry1Ac afectan su capacidad tóxica y la unión a vesículas de intestinos de *M. sexta* y *H. virescens* sin afectar la estabilidad de la toxina (Aronson A. I. *et al.*, 1995). Además, al intercambiar el dominio III entre diferentes toxinas también se logró intercambiar la especificidad. Lo anterior indica que en este dominio también se encuentran regiones que determinan a qué insectos afectará cada toxina (Bravo A., 1997).

La conservación de la estructura de las toxinas Cry ha dado pie a la hipótesis de que comparten mecanismos de acción similares (Bravo A., 1997; Schnepf E. *et al.*, 1998; Bravo A. *et al.*, 2007) (Figura 2).

Modelos del mecanismo de acción de las toxinas Cry

El mecanismo de acción de las toxinas Cry se ha caracterizado principalmente en insectos lepidópteros. Es ampliamente aceptado que consiste en la lisis de las células de la microvellosidad apical del intestino de las larvas que las consumen. La lisis es debida a la formación de poros en las membranas de dichas células. A través de los poros se da un flujo incontrolado de iones y agua, lo que culmina en la muerte del insecto (Schnepf E. *et al.*, 1998; Bravo A. *et al.*, 2007).

También se ha propuesto que la interacción de la toxina con el receptor tipo caderina de las células intestinales es suficiente para matar al insecto. Dicha interacción podría desencadenar una cascada de señalización que culminaría en la muerte celular por apoptosis (Zhang X. B. *et al.*, 2006) (Figura 3B).

El mecanismo basado en la formación de poro se ha estudiado con mayor detalle. Se ha propuesto que consiste de varios pasos: inicia con la solubilización de las inclusiones cristalinas, lo que da lugar a la protoxina.

La protoxina es activada por proteasas del intestino de las larvas mediante la remoción de los extremos amino y carboxilo terminales. Esta forma activa tiene un tamaño de entre 60 y 70 kDa dependiendo de qué toxina se trate. La toxina activa interacciona con diferentes proteínas que se encuentran en las membranas de las células intestinales. Finalmente, la toxina forma un poro que se inserta en la membrana y ocasiona lisis celular. (Schnepf E. *et al.*, 1998; Bravo A. *et al.*, 2007; Bravo A. *et al.*, 2011).

Una forma más detallada del modelo de formación de poro es la denominada de “ping-pong”, dilucidada para la toxina Cry1Ab en el lepidóptero *M. sexta*. En este modelo el dominio II de la toxina interacciona inicialmente con los receptores aminopeptidasa N (APN) y fosfatasa alcalina (ALP) presentes en alta abundancia pero que tienen una baja afinidad por la toxina. Esta primera interacción es seguida por la unión al receptor de alta afinidad tipo caderina llamado Bt-R1, la cual provoca el corte de la hélice α -1 y la formación del oligómero. El oligómero gana entonces afinidad por la APN y la ALP y finalmente se inserta en la membrana apical y forma poros (Pacheco S. *et al.*, 2009; Arenas I. *et al.*, 2010) (Figura 3A).

El modelo de formación de poro de las toxinas Cry está basado en el comportamiento de otros tipos de toxinas formadoras de poro (Parker M. W. y Feil, S. C., 2005; Geny B. y Popoff, M. R., 2006) y en el comportamiento de toxinas Cry mutantes probadas en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Además se basa en la interacción de toxinas Cry mutantes y no mutantes con proteínas como las APNs y ALPs además de las caderinas (Bravo A. *et al.*, 2007; Bravo A. *et al.*, 2011).

Por otra parte, el modelo de transducción de señales se basa solamente en experimentos realizados en líneas celulares, sin que los resultados obtenidos hayan sido extrapolados a organismos completos.

Tomando en cuenta ambos modelos, puede suponerse que la muerte de las larvas se debe a una combinación de ambos. La intoxicación podría iniciarse con la interacción de las toxinas con las proteínas de las membranas celulares. Podría entonces formar poros como propone el modelo de ping-pong y desencadenar eventos intracelulares que contribuyan a la muerte celular como propone el modelo de señalización.

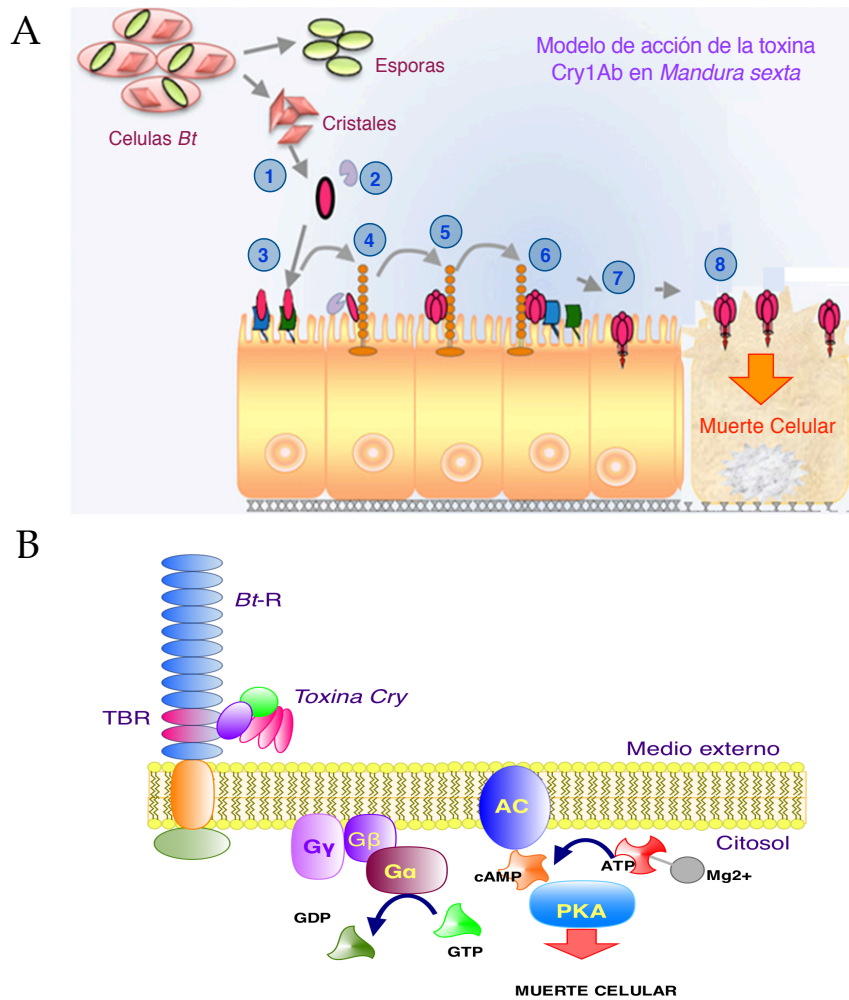


Figura 3. Modelos del mecanismo de acción de las toxinas Cry. A. El modelo de formación de poro consiste en varios pasos: 1) solubilización del cristal, 2) activación proteolítica de la toxina, 3) unión del monómero de la toxina a los receptores de baja afinidad y alta abundancia APN y ALP, 4) unión del monómero al receptor de alta afinidad caderina y corte de la hélice α -1, 5) oligomerización, 6) unión del oligómero a los receptores APN y ALP, 7) formación de poro e inserción en la membrana de las células intestinales, 8) lisis celular (Modificado a partir de Pacheco S. *et al.*, 2009). B. En el modelo de transducción de señales es suficiente la interacción con el receptor caderina (Bt-R1) para desencadenar una cascada de señales que culmina en la muerte celular (Modificado de Zhang X. B. *et al.*, 2006).

Receptores de las toxinas Cry

En las células intestinales de los insectos se han identificado diferentes proteínas que se unen a las toxinas Cry. Sin embargo, en la mayoría de los casos no ha podido relacionarse la unión con la toxicidad.

Lo anterior puede explicarse desde el punto de vista del modelo de formación de poro, ya que es posible que no todas las interacciones de la toxina con proteínas de membrana contribuyan a la formación de poros y por lo tanto no contribuyan a la toxicidad (Pigott C. R. y Ellar, D. J., 2007).

Para algunas proteínas sí se ha demostrado mediante diferentes métodos que contribuyen a la toxicidad. Estos receptores se clasifican comúnmente en dos grupos: un grupo está formado por las proteínas transmembranales denominadas “semejantes a caderinas” (cadherin like) y el otro grupo está formado por las proteínas ancladas a la membrana por glicosilfosfatidilinositol, como las APNs y las ALPs.

Caderinas

Las caderinas son parte de una familia grande y diversa de glicoproteínas presentes en vertebrados e invertebrados. Son esenciales para un gran número de procesos celulares como la adhesión entre células, señalización, comunicación, morfogénesis y mantenimiento de la estructura celular entre otras. Están compuestas de un dominio extracelular formado por 11 ó 12 módulos repetidos que tienen la capacidad de unirse a calcio, un dominio transmembranal y un dominio intracelular (Angst B. D. *et al.*, 2001).

En varias especies de insectos dípteros, lepidópteros y coleópteros las caderinas son necesarias para que las toxinas Cry ejerzan su actividad. Por ejemplo, una cepa del lepidóptero *H. virescens* obtenida en laboratorio, desarrolló resistencia a la toxina Cry1Ac debido a la inserción de un retrotransposon en un gen de caderina. El retrotransposon se localizó mediante mapeo con sondas de ADN (Gahan L. J. *et al.*, 2001).

También se han seleccionado líneas resistentes a la toxina Cry1Ac del lepidóptero *Pectinophora gossypiella* que tienen mutaciones en tres alelos de genes de caderinas (Morin S. *et al.*, 2003). En el coleóptero *T. molitor* se disminuyó la expresión del gen de caderina mediante interferencia con RNA, lo que resultó en insectos tolerantes a la toxina Cry3Aa (Fabrick J. *et al.*, 2009).

Aminopeptidasas

Las APNs son proteínas de entre 90 y 170 kDa, están ancladas a la membrana celular por medio de GPI y están decoradas con carbohidratos como N-Acetilgalactosamina (GalNac). Las modificaciones con carbohidratos son importantes para su interacción con toxinas Cry como en el caso de la toxina Cry1Ac (Knight P. J. K. *et al.*, 1994).

Las APNs son enzimas que cortan aminoácidos neutros del extremo amino terminal de los polipéptidos. En los lepidópteros trabajan junto con endopeptidasas y carboxipeptidasas en la digestión de proteínas. Los estudios filogenéticos sugieren que en lepidópteros existen cinco familias de APN y la secuencia de aminoácidos entre una clase varía entre el 56% para la clase 5 y el 67% para la clase 4. Entre las clases, la clase 2 es la más diferente ya que comparte solo el 25% a 26% de identidad con las otras clases. Las clases 1 y 3 son las más similares con una identidad de secuencia del 38%.

Todas las clases de APN se unen a alguna toxina Cry (Pigott C. R. y Ellar, D. J., 2007). Se han identificado como receptores para las toxinas Cry en diferentes especies de lepidópteros como *H. virescens* (Luo K. *et al.*, 1997; Banks D. J. *et al.*, 2001; Garner K. J. *et al.*, 1999), *Spodoptera litura* (Agrawal N. *et al.*, 2002), *H. armigera* (Rajagopal R. *et al.*, 2003), *Bombyx mori* (Nakanishi K. *et al.*, 2002; Yaoi K. *et al.*, 1997), *Lymantria dispar* (Valaitis A. P. *et al.*, 1997), *Plutella xylostella* (Nakanishi K. *et al.*, 2002) y en dípteros como *Anopheles quadrimaculatus* (Abdullah M. A. *et al.*, 2006) y *Aedes aegypti* (Bayyareddy K. *et al.*, 2009).

Al parecer las APNs están implicadas con la inserción de la toxina en la membrana. En membranas de *M. sexta* tratadas con fosfolipasa C (PLPC), que es una enzima que corta los anclajes de GPI, se disminuyó la incorporación de la toxina Cry1Ab (Bravo A. *et al.*, 2004). Además, en membranas de *Trichoplusia ni* también tratadas con PLPC, se redujo la actividad de formación de poro de la toxina Cry1Ac (Lorence A. *et al.*, 1997).

Otras evidencias también sustentan su papel como receptores. Las APNs purificadas de *H. virescens* y *M. sexta* pueden potenciar la capacidad de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac para formar poros (Luo K. *et al.*, 1997; Schwartz J. L. *et al.*, 1997). También se demostró que fragmentos producidos en *E. coli* de dos isoformas de APN (AaeAPN1 y AaeAPN2) de *Ae. aegypti* pueden inhibir la unión de la toxina Cry11Aa a vesículas de membrana del mismo insecto (Chen J. *et al.*, 2009). También se demostró que fragmentos de la APN de *Anopheles gambiae* pueden potenciar la actividad de la toxina Cry11Ba (Zhang R. *et al.*, 2008) contra *A. gambiae*. En otro trabajo, cuando se expresó la APN de *M. sexta* en *Drosophila melanogaster* esta adquirió susceptibilidad hacia la toxina Cry1Ac (Gill M. y Ellar, D., 2002).

La evidencia obtenida de la utilización de RNA interferente también sustenta el papel de las APNs como receptores. Cuando se inyectó a larvas de *S. litura* con RNA de doble cadena de una región de la APN clase 4, se redujo la producción de transcrito en un 95%. La expresión de la proteína disminuyó un 80% y la mortalidad bajó en un 75% (Rajagopal R. *et al.*, 2002). Cuando se disminuyó la expresión de la APN1 de *M. sexta* con RNA interferente, las larvas silenciadas presentaron entre 30% y 40% de supervivencia ante la intoxicación con Cry1Aa y Cry1Ab y hasta un 70% de supervivencia ante la toxina Cry1Ac (Flores-Escobar B. *et al.*, 2013). Por último, la resistencia de una población de *S. exigua* hacia la toxina Cry1C se atribuyó a la carencia de transcrito de RNA de APN-1 (Herrero S. *et al.*, 2005).

Fosfatasa alcalina (ALP)

Las fosfatasa alcalina (ALP) están presentes en todos los animales. En el caso de los insectos se han estudiado más ampliamente en los lepidópteros y pertenecen a dos grandes grupos: las formas solubles (s-ALP) y las que están unidas a la membrana celular (m-ALP). Las ALPs ancladas a la membrana son similares a las de los mamíferos en la localización, en el anclaje a la membrana por medio de GPI y en la presencia de grupos de carbohidratos en la región extracelular.

Ambas versiones se localizan mayormente en las células epiteliales del intestino medio. Sin embargo también se encuentran en las regiones posterior y anterior del intestino. Su proporción varía dependiendo de la región del intestino en el que se encuentren. La actividad de las ALPs es la absorción activa de metabolitos (Eguchi M., 1995).

El papel de las ALPs como receptores de las toxinas Cry se apoya en varias líneas de evidencia. Utilizando vesículas sintéticas se demostró que una mezcla de APN y ALP de *M. sexta* ayuda a que la toxina Cry1Ac forme poros. La formación de poros se evidenció por la liberación de $^{86}\text{Rb}^+$ y K^+ de las vesículas (Sangadala S. *et al.*, 1994). En el insecto *H. virescens* se demostró que debido a una baja expresión de ALP las larvas de este insecto se volvían tolerantes a la toxina Cry1Ac (Jurat-Fuentes J. L. *et al.*, 2004).

En otro trabajo, a partir de una biblioteca de péptidos aleatorios desplegados en fagos, se aisló un péptido que se une a la ALP del díptero *Ae. aegypti*. Este péptido bloqueó la interacción de la toxina Cry11Aa con vesículas de intestinos de *Ae. aegypti* e inhibió su toxicidad (Fernandez L. E. *et al.*, 2006).

Más recientemente se demostró que mutantes de la toxina Cry1Ab con menor capacidad de unión a la ALP de *M. sexta* pierden actividad tóxica. También se demostró que en *M. sexta* la ALP se expresa preferentemente en estadios tempranos del desarrollo larvario. Esta expresión diferencial además es congruente con la pérdida de susceptibilidad a las toxinas a medida que las larvas se desarrollan (Arenas I. *et al.*, 2010).

Finalmente, en larvas de *M. sexta* se disminuyó la expresión de ALP mediante RNA interferente. Estas larvas presentaron entre 40 y 50% de supervivencia ante la exposición a las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac y hasta un 80% de supervivencia ante la toxina Cry1Ab (Flores-Escobar B. *et al.*, 2013).

Se ha reportado ALPs de *Ae. aegypti* como receptores de las toxinas Cry4Ba y Cry11Ba (Bayyareddy K. *et al.*, 2009; Hua G. *et al.*, 2009). También se reportó una ALP del coleóptero *Anthonomus grandis* como receptor de la toxina Cry8Ka5 (Martins E. S. *et al.*, 2010). Sin embargo estos estudios se realizaron con técnicas proteómicas y no se ha confirmado si las proteínas identificadas funcionan como receptores.

Las caderinas, APNs y ALPs son las proteínas que se han estudiado más ampliamente como posibles receptores, pero también se han considerado otras moléculas como posibles receptores. También se ha propuesto como receptores a transportadores ABC, VATPasas, proteínas de choque térmico (Heat shock proteins), ATP sintetasas, actina, flotilina y prohibitina (Pigott C. R. y Ellar, D. J., 2007; Zúñiga-Navarrete F. *et al.*, 2012).

La diversidad de proteínas que se han asociado a la acción de las toxinas Cry es indicador del interés por el descubrimiento de los receptores que confieren susceptibilidad a estas toxinas. Dicho interés radica en la utilidad de conocer a estos receptores y con ello dilucidar el mecanismo mediante el cual las toxinas Cry ejercen su actividad. El entendimiento de su mecanismo de acción a su vez, puede ser útil para idear métodos para combatir el desarrollo de insectos resistentes, cuya adaptación más común son los cambios en la interacción toxina-receptor y para desarrollar toxinas con actividades incrementadas hacia ciertos insectos blanco.

ANTECEDENTES PARTICULARES

La toxina Cry3Aa

Las subespecies *tenebrionis* y *san diego* de la bacteria *B. thuringiensis* producen una inclusión cristalina compuesta por proteínas que varían entre 73 y 65 kDa. A diferencia de la mayoría de las cepas de *B. thuringiensis*, en estas la producción de la toxina comienza de manera temprana durante la última fase de crecimiento vegetativo (Sekar V., 1988). La producción temprana de la toxina incrementa el tiempo de exposición a las proteasas de la bacteria. Quizá por ello, en etapas tempranas del desarrollo celular se pueden aislar péptidos de mayor tamaño (74 y 72 kDa). Los cristales cosechados después de la liberación espontánea, por otra parte están compuestos de péptidos de 72, 67 y 55 kDa. La degradación temprana de los cristales posiblemente se debe a que la forma rectangular plana del cristal es una área fácilmente accesible para las proteasas endógenas (Carroll J. *et al.*, 1989).

La toxina Cry3Aa fue la primera de la familia Cry para la que se determinó la estructura cristalográfica mediante difracción de rayos X. Este trabajo se realizó con una forma de la toxina compuesta de 644 residuos aminoácidos obtenida por proteólisis parcial de los cristales con papaína. En este trabajo se definieron los siguientes tres dominios de la toxina Cry3Aa: El dominio I que comprende desde el N-terminal hasta el residuo 290, el dominio II desde el residuo 291 al 500 y el dominio III que abarca desde el residuo 501 hasta el 644 (Li J. D. *et al.*, 1991) (Figura 4).

Se ha sugerido que la protoxina Cry3Aa de 73 kDa puede ser considerada como una versión naturalmente trunca de las toxinas con actividad contra lepidópteros. Sin embargo, a diferencia de estas toxinas cuyo proceso de solubilización y activación es bien comprendido, la toxina Cry3Aa se disuelve solo en condiciones de pH muy ácido ($\text{pH} < 4$) ó alcalino ($\text{pH} > 10$) (Koller C. N. *et al.*, 1992).

La toxina Cry3Aa precipita en condiciones de pH cercano a la neutralidad, lo cual la hace fácil de recristalizar una vez disuelta (Carroll J. *et al.*, 1989). Una explicación para este comportamiento se deriva de la estructura cristalográfica, es la presencia de cuatro puentes salinos (Asp 142-Arg 165, Asp 224-Arg 562, Asp 590-Arg 178, Glu 223-Lys 293) que unen entre sí a tres diferentes moléculas vecinas en el arreglo cristalino (Li J. D. *et al.*, 1991).

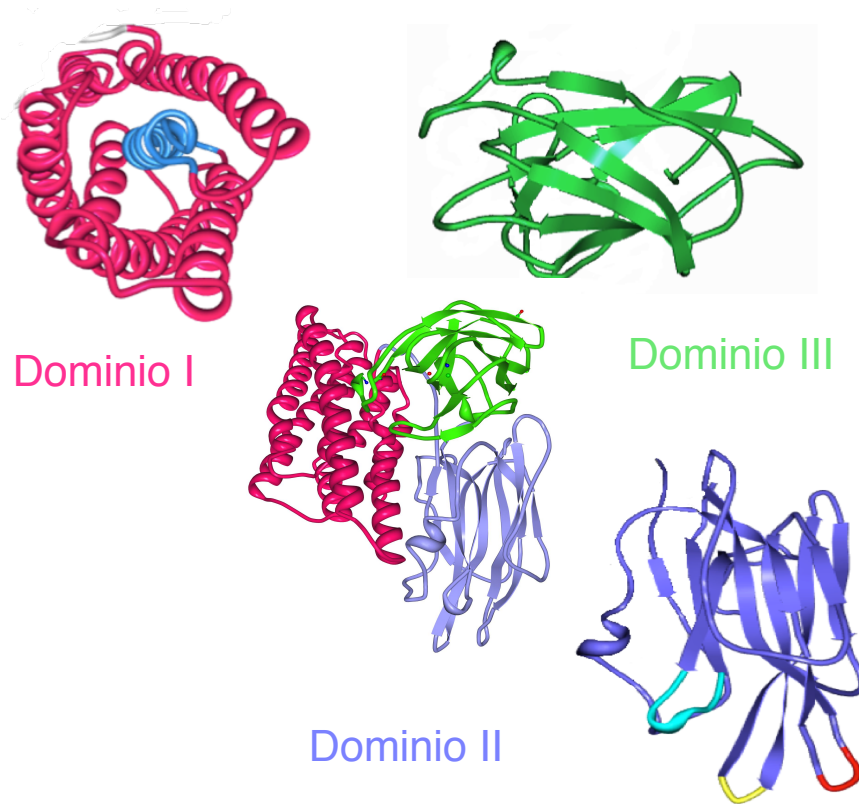


Figura 4. Estructura de la toxina Cry3Aa. Se muestran los dominios desglosados a partir de la secuencia de la toxina Cry3Aa (PDB: 1DLC) (Li J. D. *et al.*, 1991) con colores diferentes. En el dominio I se resalta la hélice α -5 en azul y en el dominio II las tres asas: el asa 1 en rojo, el asa 2 en amarillo y el asa 3 en azul. Las estructuras fueron modeladas a partir las secuencias del PDB utilizando el programa PDB Protein Workshop 3.9 (Moreland J. L. *et al.*, 2005).

El mecanismo de acción de la toxina Cry3Aa es poco comprendido. La toxina Cry3Aa es tóxica para coleópteros de la familia *Chrysomelidae* (Figura 5), es decir escarabajos que se alimentan de hojas. Sin embargo la toxina Cry3Aa es poco soluble en los intestinos de estos insectos cuyo ambiente es medianamente ácido con un pH de entre 4.5 y 6.6 (Koller C. N. *et al.*, 1992). La baja solubilidad de la toxina Cry3Aa en los intestinos de los insectos susceptibles hace suponer que esta propiedad puede ser importante para la actividad tóxica. También podrían existir otros factores en los intestinos de los insectos susceptibles que potencian la solubilidad, tales como enzimas digestivas ó surfactantes (Martin M. M. y Martin, J. S., 1984).

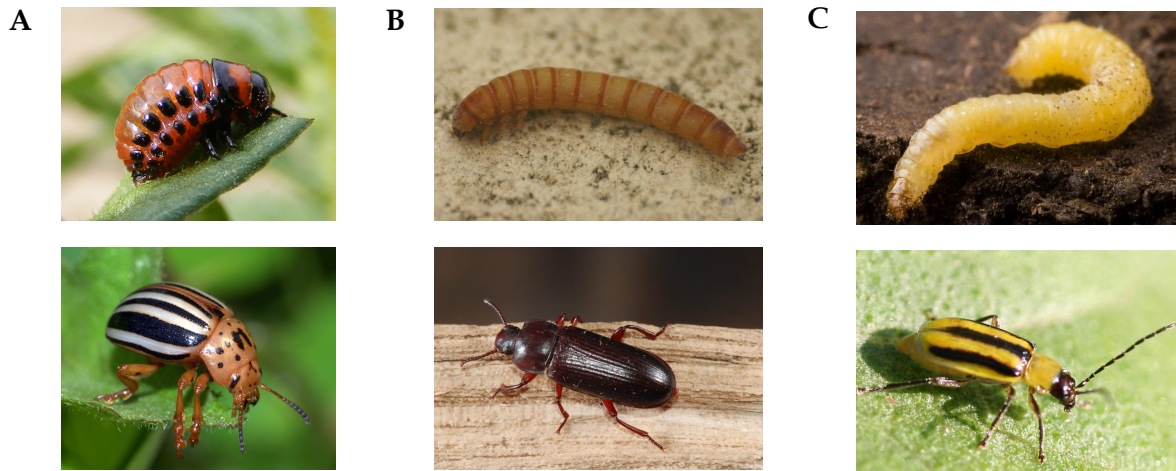


Figura 5. La toxina Cry3Aa es activa contra insectos coleópteros. A. *Leptinotarsa decemlineata* de la familia *chrysomelidae* en su forma de larva (superior) y adulta (inferior). B. *Tenebrio molitor* de la familia *tenebrionidae* en forma de larva (superior) y adulta (inferior) C. *Diabrotica virgifera virgifera* de la familia *chrysomelidae* en forma de larva (superior) y adulta (inferior)

Los experimentos de activación *in vitro* de la toxina Cry3Aa muestran que se generan péptidos de diferentes tamaños dependiendo de la proteasa que se emplee. Cuando se utiliza la tripsina, una enzima comúnmente utilizada para la activación de toxinas activas contra lepidópteros, se genera un fragmento mayoritario de 55 kDa con actividad tóxica (Carroll J. *et al.*, 1989; Wu S. J. y Dean, D. H., 1996) (Figura 6).

Además del fragmento de 55 kDa se producen fragmentos de 8 y 11 kDa. Estos permanecen asociados al fragmento mayoritario y no es posible separarlos mediante filtración en gel (Carroll J. *et al.*, 1997). Los fragmentos de 55, 8 y 11 kDa también se obtienen cuando la toxina Cry3Aa se activa con jugo gástrico del coleóptero *T. molitor* (Wu S. J. y Dean, D. H., 1996) ó del lepidóptero *Pieris brassicae* (Carroll J. *et al.*, 1997) (Figura 6).

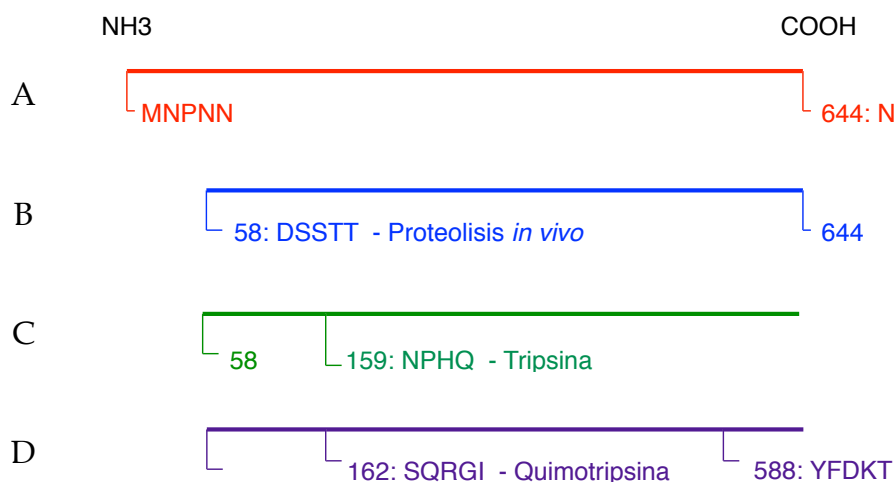


Figura 6. Esquema de los fragmentos obtenidos de la activación de la toxina Cry3Aa. A. Producto del gen de la toxina Cry3Aa. B. La toxina Cry3Aa se proteoliza *in vivo*, en la bacteria *B. thuringiensis* lo que resulta en un fragmento de 67 kDa. C. La activación con tripsina ó con jugo gástrico de *T. molitor* resulta en un fragmento de 55 kDa y polipéptidos de entre 3 y 11 kDa. D. La activación *in vitro* con quimotripsina, ó *in vivo* en el intestino de *Leptionotarsa decemlineata* resulta en un fragmento mayoritario de 49 kDa, además del fragmento de 55 kDa y péptidos de entre 6 y 11 kDa. Los números indican la posición en la secuencia de la toxina Cry3Aa (Modificado de Carrol J. *et al.*, 1997).

Cuando la toxina Cry3Aa se activa utilizando quimotripsina se obtiene un fragmento mayoritario de 49 kDa y fragmentos de 6, 8 y 11 kDa. Aparentemente la activación con quimotripsina procede vía un intermediario de 55 kDa que permanece en la mezcla como remanente de una activación incompleta. Sin embargo, no se sabe si todos los fragmentos son necesarios para que la toxina Cry3Aa sea tóxica.

La toxina Cry3Aa activada con quimotripsina permanece soluble en un pH cercano a la neutralidad y es la activación más parecida a lo que sucede en el intestino de los insectos susceptibles como *Leptinotarsa decemlineata*. En ensayos de activación *in vivo* con este insecto, se generó el fragmento de 49 kDa a partir de 1 hora de permanencia de la toxina en el intestino (Carroll J. *et al.*, 1997) (Figura 6). Esta forma de toxina activada, además de ser tóxica se une a vesículas de membrana de *L. decemlineata* y forma poros en ellas (Rausell C. *et al.*, 2004).

Receptores de la toxina Cry3Aa

El coleóptero *L. decemlineata* es un miembro de la familia *chrysomelidae* que tiene gran importancia económica en Europa y parte de Norteamérica ya que ataca a los cultivos de papa. En este insecto se reportó una ADAM metaloproteasa capaz de procesar proteolíticamente a ciertas regiones de la toxina Cry3Aa (Rausell C. *et al.*, 2004).

Posteriormente se demostró que cuando se inhibe la actividad de la ADAM10 se disminuye la capacidad de la toxina Cry3Aa para formar poros en vesículas de membrana de *L. decemlineata*.

En este trabajo también se demostró que un péptido sintético con la secuencia del asa 1 del dominio II de la toxina Cry3Aa puede bloquear la interacción de la toxina con la ADAM10 (Ochoa-Campuzano C. *et al.*, 2007). De esta manera se identificó al asa 1 del dominio II de la toxina Cry3Aa como el sitio de interacción con la ADAM10 (Ochoa-Campuzano C. *et al.*, 2007).

El escarabajo *T. molitor* no es propiamente una plaga, pero puede resultar perjudicial para los granos y harinas almacenados. Dado su fácil cultivo y mantenimiento, este insecto se ha utilizado como organismo modelo para el estudio de los coleópteros. En un trabajo reciente, las proteínas del intestino de este insecto se separaron mediante SDS-PAGE y se realizaron ensayos de unión a ligando utilizando la toxina Cry3Aa. Aquellas proteínas a las que la toxina se unió se secuenciaron y se identificaron dos proteínas: una α -amilasa y una VATPasa (Bulushova N. V. *et al.*, 2011).

En *T. molitor* también se identificó una proteína tipo caderina denominada TmCad1. El repetido 12 de la región extracelular de esta caderina (rTmCad1p) en combinación con vesículas de intestinos de *T. molitor*, promueve la formación de estructuras oligoméricas de la toxina Cry3Aa. El papel como receptor funcional de esta caderina se sustentó en experimentos de interferencia con RNA. En estos ensayos, el RNA del transcrito de la caderina disminuyó aproximadamente el 80% en las larvas inyectadas y se volvieron tolerantes a la intoxicación con Cry3Aa (Fabrick J. *et al.*, 2009).

Posteriormente se demostró que de forma similar a lo observado con caderinas de lepidópteros, el fragmento de caderina rTmCad1p potencia la actividad de la toxina Cry3Aa contra coleópteros como *Crioceris quatuordecimpunctata* (15.3 veces), *Colaphellus bowringi* (7.9 veces) y *Phaedon brasicae* (4.3 veces) (Gao Y. *et al.*, 2011).

En el coleóptero *Diabrotica virgifera virgifera* también se identificó a una caderina. Por comparación con las caderinas de lepidópteros se identificó a los repetidos 8 a 10 como posibles sitios de interacción con las toxinas Cry (Sayed A. *et al.*, 2007). Posteriormente se confirmó que los repetidos 8-10 interaccionan con las toxinas Cry3Aa (Kd = 11.8 nM) y Cry3Bb (Kd= 1.4 nM). Además, el fragmento de proteína que comprende los repetidos 8 a 10 de esta caderina, potencia la actividad de las toxinas Cry3Aa y Cry3Bb contra *L. decemlineata* (Cry3Aa 3.7 veces más tóxica, Cry3Bb 6.4 veces más tóxica), *D. virgifera virgifera* (Cry3Bb 13 veces más tóxica) y *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Cry3Aa 2.9 veces más tóxica, Cr3Bb 8.4 veces más tóxica) (Park Y. *et al.*, 2009).

La evidencia obtenida de estos dos últimos antecedentes apunta a que las proteínas de tipo caderina juegan el papel de receptores de las toxinas Cry también en los coleópteros, lo que a su vez respalda la conservación del mecanismo de acción de las toxinas Cry en diferentes ordenes de insectos.

HIPÓTESIS

Debido a las similitudes estructurales y a evidencias como su capacidad para formar poros y a los receptores identificados, se puede inferir que la toxina Cry3Aa posee un mecanismo de acción similar a las toxinas Cry1As en cuanto a la interacción secuencial con receptores y en la forma de matar a sus insectos blanco. Así mismo, la especificidad y potencia tóxica de la toxina Cry3Aa tienen su origen en la interacción con sus receptores.

OBJETIVOS

Caracterizar las interacciones de la toxina Cry3Aa con las membranas de las células intestinales del coleóptero *Tenebrio molitor*.

Identificar a las proteínas de las células intestinales de *T. molitor* capaces de unirse a la toxina Cry3Aa.

Desarrollar herramientas para el estudio de la interacción entre la toxina Cry3Aa con un receptor.

Analizar la relación entre toxicidad y afinidad de la toxina Cry3Aa por un fragmento del receptor caderina del coleóptero *T. molitor*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas

Bacillus thuringiensis variedad *tenebrionis*. Contiene al gen de la proteína Cry3Aa

Bacillus thuringiensis variedad *berliner/1715*. Contiene al gen de la proteína Cry1Ab en el plásmido pHcPP que contiene la resistencia a eritromicina.

Escherichia coli DH5 α : F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ -. Se transforma con alta eficiencia. La mutación end A1 inactiva una endonucleasa intracelular que degrada ADN de plásmidos. Alcanza una OD₆₀₀ de 0.6 en 2-4 horas.

Escherichia coli ER2566: F- λ - fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene 1 gal sulA11 Δ (mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]. Cepa para la expresión de genes de forma heteróloga. Contiene una copia cromosómica de la T7 RNA polimerasa insertada en el gen lacZ bajo el control del promotor lac. En ausencia de IPTG la inducción de la expresión de la T7 RNA polimerasa se suprime por la unión del represor lacI al promotor lac. Es deficiente en las proteasas lon y ompT.

Escherichia coli XL1-Blue MRF' (Stratagene): Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac *F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)*. Cepa utilizada en infección, amplificación y expresión del fago lamda. Posee resistencia a tetraciclina.

Escherichia coli SCS110 (Stratagen): Carece de las metilasas Dam y Dcm que se encuentran en la mayoría de las cepas de *E. coli*. Dam metilasas reconocen secuencias GATC y metilan el residuo de adenina en la posición N-6, mientras que las metilasas Dcm reconocen la secuencia CCAGG y CCTGG y metilan la citocina interna en la posición C-5. Contienen el gen acIqZ Δ M15 en el epitoma F', permitiendo la selección entre colonias blancas y azules.

Bacillus thuringiensis 407 Bt- Cepa que no produce cristales de proteína.

Bacteriofago VCSM13: Bacteriofago de Stratagen derivado del bacteriofago M13.

Medios de cultivo

Medio SP: Caldo nutritivo 8g/L, MgSO₄·7H₂O 0.25 g/L, KCl 1.0 g/L, Stock 1 (MnCl₂·4H₂O 0.00198 g/L), Stock 2 (Fe(SO₄)·7H₂O 0.0366 g/L en H₂SO₄ 0.028 N), Stock 3 (CaCl₂·2H₂O 0.072 g/L), pH 7.0

Medio 2xTY: Triptona 16 g/L, Extracto de levadura 10 g/L, NaCl 5 g/L (Sólido: adicionar agar 15 g/L)

Medio LB: Peptona 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L

Medio SOC: Triptona (20 g/L), Extracto de levadura (5.0 g/L), NaCl (0.5 g/L), KCl (0.186 g/L), MgCl₂ (0.095 g/L), Glucosa (0.5% v/v)

TOP-Agarosa: (Bacto triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L, agarosa 6 g/L).

Péptidos sintéticos

Todos los péptidos fueron sintetizados por JPT Peptide Technologies.

Péptido sintético del asa 1 del dominio II de la toxina Cry3Aa:

H-NHRFQPGYYGNDSFN-NH₂

Péptido sintético del CDR1 del anticuerpo V_{HH}A5: H-AYNFSNYW-OH

Péptido sintético del CDR2 del anticuerpo V_{HH}A5: H-VGIVYPGDSHI-OH

Péptido sintético del CDR2 del anticuerpo V_{HH}A5: H-ARQSIIPVGGLMRGDAFDI-OH

Oligonucleótidos:

Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados en la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología-UNAM.

pSyn1: 5'-ATA CCT ATT GCC TAC GGC-3'

pSyn2: 5'-TTT CAA CAG TCT ATG CGG-3'

Cry3A1: 5'-CGA-CCA-GGA-TTC-TTC-GGA-AAT-GAC-3'

3AMUT3: 5'-CAA-TTT-CAC-ACG-GCG-TTC-CAA-CCA-GGA-TTC-3'

Plásmidos

Fagémido pSyn2: Fagémido utilizado para el despliegue en fagos, posee resistencia a ampicilina y un péptido señal que permite el paso de la proteína de fusión del citoplasma al periplasma celular. Tiene los orígenes de replicación de *E. coli* y del fago M13

pET22b-CR12: Vector de expresión pET22b (Novagene) conteniendo la secuencia del CR12 de la caderina de *Tenebrio molitor*.

pET32b-A5: Vector de expresión pET32b (Novagene) conteniendo la secuencia del anticuerpo V_{HHA5}

pHT305-Cry3Aa: Vector de expresión para *Bacillus thuringiensis* conteniendo el gen de la toxina Cry3Aa.

Purificación de la toxina Cry3Aa

Se inocularon volúmenes de 200 mL de medio SP con una asada de la bacteria *B. thuringiensis* variedad *tenebrionis*. Los cultivos se incubaron durante 72 horas a 30°C con agitación. La mezcla de esporas y cristales se recuperó mediante centrifugación a 2,500 x g. El pellet resultante se lavó tres veces con solución TET (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, Tritón 0.05%, pH 7.5). La mezcla de esporas y cristales se resuspendió en amortiguador TTN (Tris 20 mM, NaCl 300 mM, Tritón X-100 0.1%, pH 7.2) y se sonicó tres veces durante un minuto con 80% de intensidad. Los cristales se purificaron mediante gradientes discontinuos de sacarosa al 84%, 74%, 72% y 67% (w/v). Los cristales se solubilizaron en amortiguador de carbonatos (50 mM Na₂CO₃, pH 10.2) con 0.1% de β-mercaptoetanol a 37°C por 12 horas. La toxina soluble se recuperó por centrifugación a 6,708 x g. La concentración de proteína se midió por el método de Bradford utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

El pH de la solución de toxina se ajustó a 9.0 - 9.5 con Tris-HCl 50 mM pH 8. A la solución de toxina se adicionó quimotripsina (Sigma) a una proporción 2:1 w/w enzima:sustrato y se incubó a 37°C por 12 horas. La reacción se detuvo por adición de PMSF hasta una concentración final de 0.1 mM. La toxina activada se dializó en amortiguador 1 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM pH 8.0). La toxina activada se purificó por cromatografía de intercambio iónico con una columna de sefarosa HiTrap™ (GE Healthcare Life Sciences) y un gradiente de NaCl (0 a 500 mM) utilizando un equipo de FPLC (ÄKTA-GE Healthcare Life Sciences).

Marcaje con biotina

Las toxinas Cry3Aa y A1 activadas se dializaron en amortiguador de boratos (ácido bórico 0.05 M, NaOH 0.05 M, NaCl 0.15 M, pH 8.6). A la solución de toxina se le adicionó la solución de biotina (GE Healthcare UK Unlimited) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El exceso de biotina se retiró por filtración con una columna empacada con Sephadex G-25 (GE-Healthcare) y el marcaje se verificó por Western-blot utilizando streptavidina acoplada a peroxidasa (Millipore).

Purificación de VMMA de *T. molitor*.

Se extrajeron intestinos de larvas de *T. molitor* y se lavaron con solución I fría (manitol 300 mM, Tris-HCl 17.0 mM, EGTA 5.0 mM, DTT 2.0 mM, PMSF 0.5 mM). Un gramo de intestinos se homogeneizó en solución II (manitol 300 mM, Tris-HCl 17 mM, EGTA 5 mM, DTT 2 mM, EDTA 1 mM, Leupeptina 100 µg/mL, Pepstatina 150 µg/mL, PMSF 0.1 mM, Sulfato de neomicina 2.4 µg/mL, pH 7.4). Se utilizó un homogeneizador WiseStir® HS-30E de Wisd Laboratory Instruments. La mezcla homogénea de intestinos se precipitó con MgSO₄ 24 mM frío (1 volumen equivalente) por 30 minutos. Se centrifugó a 2,500 x g por 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se recuperó. El sobrenadante se centrifugó a 30,000 x g por 20 minutos y la pastilla resultante se recuperó. La pastilla se resuspendió en amortiguador II (1/2 del volumen original) y se le agregó MgSO₄ 24 mM frío (1 volumen equivalente). La solución se centrifugó a 30,000 x g por 20 minutos y la pastilla se recuperó. La pastilla resultante se resuspendió en 500 µL de solución II. La concentración de proteína de esta solución se determinó con el kit DC™ Protein Assay (BioRad) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Determinación de actividades enzimáticas en VMMA

Para la actividad de aminopeptidasa se preparó una solución de L-leucina-p-nitroanilida a una concentración de 10 mM (Sigma). Se mezclaron 400 µL de agua bidestilada, 200 µL de Tris-HCl 1M pH 8, 250 µL de NaCl 1 M y 5 µL de las VMMA. A esta solución se le agregaron 100 µL de la solución de L-leucina-p-nitroanilida. La absorbancia a 405 nm se registró durante 1-10 minutos. Para calcular la actividad se consideró que 0.1 unidades de absorbancia equivalen a 1 µmol/minuto de producto.

Para la actividad de fosfatasa alcalina se disolvieron 20 µg de las VMMA en 500 µL de la solución de reacción (1 mg/mL p-nitrofenol fosfato (Sigma), 0.5 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 9.5) la mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y la reacción se detuvo por adición de 500 µL de una solución 250 mM de EDTA pH 8. La absorbancia se leyó a 405 nm y la actividad específica de la muestra se determinó mediante una curva estándar. Se consideró que una unidad de enzima se define como la cantidad en mg de proteína necesaria para transformar 1 nmol de p-nitrofenol en fosfato en 1 minuto.

Tratamiento de VMMA con fosfolipasa C

Las VMMA se lavaron dos veces mediante centrifugación ($120,744 \times g$ por 15 minutos) y resuspensión en amortiguador de disección I. Las VMMA se cuantificaron por la técnica de Lowry con el kit DCTM Protein Assay (BioRad) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Cantidades de 100 μg de vesículas se incubaron con 1 unidad de fosfolipasa C de *Bacillus cereus* (PLPC) (Sigma) a 30°C durante 2 horas con agitación ligera. Las proteínas ancladas por GPI se separaron del resto de las proteínas de las VMMA mediante centrifugación a $215,000 \times g$ durante 30 min a 5°C.

Western blot

Las muestras se resolvieron por SDS-PAGE y las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore). La membrana se bloqueó con una solución de leche al 5% en PBS 1x ($\text{NH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.386 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.022 g/L, NaCl 8.5 g/L) y Tween 20 al 0.1% (PBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). La membrana se lavó durante 15 minutos con PBS-T dos veces. El anticuerpo primario anti c-Myc (Amersham) se utilizó a una dilución 1:10,000 en PBS-T. La membrana se incubó por 1 hora a TA en la solución de anticuerpo y se lavó dos veces con PBS-T durante 15 minutos por lavado. El anticuerpo secundario anti-ratón (Zymed) se utilizó a una dilución 1:10,000. La membrana se incubó en la solución de anticuerpo durante 1 hora a TA y se lavó con PBS-T dos veces durante 15 minutos cada una y con PBS 1x durante 10 minutos. Las bandas se visualizaron utilizando el kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

En el caso de las toxinas marcadas con biotina, la membrana se bloqueó con BSA al 2% en PBS-T. La marca se detectó con una dilución 1:30,000 de streptavidina acopada a peroxidasa (Millipore). La membrana se lavó dos veces con agua bidestilada. Se realizaron dos lavados de 15 minutos cada uno con PBS-T. La membrana se incubó en PBS 1x durante 10 minutos. Las bandas se visualizaron utilizando el kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

Ensayos de unión en solución tipo Bosch

Se mezclaron 10 µg de VMMA con la toxina Cry3Aa ó la toxina A1 marcadas con biotina (3Aa* ó A1*) (2.5 - 64 nM) en un volumen final de 100 µL de solución amortiguadora de unión (PBS 1x, Tween-20 0.1%) (BU). La mezcla se incubó durante 2 horas a TA. La toxina Cry3Aa* ó A1* que no se unió a las vesículas se separó por centrifugación a 20,800 x g durante 20 minutos. La pastilla se recuperó, se lavó con 100 µL de BU y se centrifugó 20,800 x g durante 20 minutos. La pastilla se recuperó y se solubilizó en 10 µL de PBS 1x. La pastilla solubilizada se resolvió mediante SDS-PAGE y la toxina Cry3Aa* ó A1* unida a las vesículas se detectó mediante Western-blot utilizando streptavidina acoplada a peroxidasa.

En el caso de los ensayos de competencia, el competidor (toxina Cry3Aa no marcada ó toxina Cry1Ab no marcada) se agregó a la mezcla de toxina Cry3Aa* y VMMA en un volumen final de 100 µL de BU. La mezcla resultante se incubó durante 2 horas a TA. La toxina Cry3Aa* y el competidor (toxina Cry3Aa no marcada ó toxina Cry1Ab no marcada) que no se unieron a las vesículas se separaron por centrifugación a 20,800 x g durante 20 minutos. La pastilla se recuperó, se lavó con 100 µL de BU y se centrifugó 20,800 x g durante 20 minutos. La pastilla se recuperó y se solubilizó en 10 µL de PBS 1x. La pastilla solubilizada se resolvió mediante SDS-PAGE y la toxina Cry3Aa* unida a las vesículas se detectó mediante Western-blot utilizando streptavidina acoplada a peroxidasa.

En el caso de la unión a vesículas tratadas con PLPC, la pastilla obtenida después del tratamiento con PLPC se cuantificó por el método de Lowry. Se tomaron 10 µg de esta muestra y se mezclaron con la toxina Cry3Aa* en un volumen final de 100 µL de BU. La mezcla se incubó durante 2 horas a TA. La toxina Cry3Aa* no unida a las vesículas se separó por centrifugación a 20,800 x g durante 20 minutos. La pastilla se recuperó, se lavó con 100 µL de BU y se centrifugó 20,800 x g durante 20 minutos. La pastilla se recuperó y se solubilizó en 10 µL de PBS 1x. La pastilla solubilizada se resolvió mediante SDS-PAGE y la toxina Cry3Aa* unida a las vesículas se detectó mediante Western-blot utilizando streptavidina acoplada a peroxidasa.

En el caso de las competencias utilizando el anticuerpo V_{HH}A5 y el fragmento CR12, la toxina Cry3Aa* ó la toxina A1* se incubaron durante 1 hora a 30 °C con el competidor. Posteriormente, a la mezcla de toxina Cry3Aa* ó A1* y competidor se agregaron 10 µg de las VMMA en un volumen final de 100 µL de BU. La mezcla se incubó durante 2 horas a TA. La toxina Cry3Aa* ó A1* no unida a las vesículas se separó por centrifugación a 20,800 x g durante 20 minutos. La pastilla se recuperó, se lavó con 100 µL de BU y se centrifugó 20,800 x g durante 20 minutos. La pastilla se recuperó y se solubilizó en 10 µL de PBS 1x. La pastilla solubilizada se resolvió mediante SDS-PAGE y la toxina Cry3Aa* ó A1* unida a las vesículas se detectó mediante Western-blot utilizando streptavidina acoplada a peroxidasa.

Ensayos de unión a ligando (ligand blot)

Las VMMA ó las proteínas ancladas por GPI se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (GE-Healthcare). La membrana se bloqueó con BSA al 2% en PBS-T durante 2 horas a TA y se lavó dos veces con PBS 1x durante 15 minutos por lavado. La membrana bloqueada se incubó con una solución de toxina Cry3Aa marcada con biotina (Cry3Aa*) en PBS-T durante 2 horas a TA. El exceso de toxina Cry3Aa* se lavó dos veces con PBS-T durante 15 minutos por lavado. La membrana se incubó en una solución 1:50,000 de streptavidina acoplada a peroxidasa (Millipore) en PBS-T durante 1 hora a TA. El exceso de streptavidina-peroxidasa se lavó 2 veces con agua bidestilada durante 1 minuto por lavado y 2 veces con PBS-T durante 15 minutos por lavado. La toxina Cry3Aa* unida a las proteínas fijas en la membrana se detectó con el kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

Ensayos de actividad en gel

Las VMMA se lavaron dos veces por centrifugación a 13,416 x g y se resuspendieron en amortiguador I para VMMA. Las VMMA o las proteínas ancladas por GPI se mezclaron con amortiguador de carga no desnaturizante (Glicerol 40%, Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 y azul de bromofenol) y sin someterse a calentamiento se resolvieron por SDS-PAGE. El gel resuelto se lavó dos veces con PBS 1x y se incubó con solución amortiguadora de revelado (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, pH 9.5) durante 20 minutos a TA.

Para revelar, el gel se incubó en solución amortiguadora de revelado con 0.75% v/v de NBT (azul de nitrotetrazolio al 5% w/v en dimetilformamida al 70%) y 0.35% v/v de BCIP (5% w/v 5-bromo-4-cloro-3-indol L fosfato en dimetilformamida). Ambos reactivos de Sigma. El gel se incubó en la solución de revelado hasta la visualización de un precipitado violeta. La reacción se detuvo cambiando la solución de revelado por una solución de EDTA 250 mM pH 8.0.

El amortiguador ácido para el ensayo de actividad de fosfatasa alcalina consistió de ácido ascético 0.1 M 35.7% v/v, acetato de sodio 0.1 M 64.3% v/v pH 5, NBT y BCIP.

Titulación de fagos M13 ayudadores por unidades formadoras de placas (pfu)

La cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF' se cultivó en medio LB líquido hasta una densidad óptica medida a 600 nm de 0.6. Se agregaron 300 µL del cultivo de *E. coli* XL1-Blue MRF' a 3.5 mL de medio TOP-Agarosa. La mezcla de medio y cultivo se decantó en una caja de Petri con medio LB sólido sin antibiótico.

Se realizaron diluciones seriadas de las soluciones de fagos a titular hasta un factor de dilución de 10⁻¹². Volúmenes de 10 µL de cada dilución se depositaron sobre las cajas de Petri en las que se decantó la mezcla de medio TOP-agarosa y el cultivo de *E. coli*. Las cajas se incubaron a 37 °C durante 12 horas. El título de fagos se determinó contando la cantidad de placas de crecimiento retardado en los sitios en los que se depositaron los volúmenes de cada dilución de fagos. Se utilizó la relación:

$$\text{pfu/mL} = (\text{Numero de placas/mL}) * (\text{factor de dilución})$$

Rescate de la biblioteca de anticuerpos de llama (*Lama glama*) desplegados en fagos.

Volúmenes de 50 mL de medio 2xTY con 200 µg/mL de ampicilina, 15 µg/mL de tetraciclina y 1% de glucosa se inocularon con 50 µL de la biblioteca de anticuerpos. Los cultivos se incubaron a 37 °C con agitación hasta una densidad óptica de 0.7 medida a 600 nm. El fago ayudador M13 se agregó al cultivo a una relación 1:20 (bacterias:fagos). El cultivo se incubó a 37 °C sin agitación por 45 minutos y después a 37 °C en agitación por 45 minutos. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 2,500 x g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó. El paquete celular se resuspendió en 20 mL de medio 2xTY con 200 µg/mL de ampicilina, 5 µg/mL de tetraciclina y 70 µg/mL de kanamicina. Con 10 mL de la suspensión celular se inocularon 100 mL de medio 2xTY con 200 µg/mL de ampicilina, 5 µg/mL de tetraciclina y 70 µg/mL de kanamicina. El cultivo se incubó durante 12 horas a 30 °C con agitación. El cultivo se centrifugó a 8,500 x g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se le agregó 1/5 de volumen de PEG (Polietilenglicol 8,000 20%, NaCl 5 M). La mezcla se precipitó durante 12 horas a 4°C. El precipitado se recuperó por centrifugación a 8,500 x g por 40 minutos a 4°C. El pellet se solubilizó en PBS 1x (30% del volumen de PEG inicial) y se le agregó PEG (15% del volumen total obtenido). La mezcla se precipitó durante 4 horas a 4°C. El precipitado se recuperó por centrifugación a 8,500 x g por 40 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en 10 mL de PBS 1x. Los fagos desplegando anticuerpos obtenidos se titularon con el método de unidades formadoras de colonias.

Titulación de fagos por unidades formadoras de colonias (ufc)

Se realizaron diluciones seriadas de las muestras de fagos hasta un factor de dilución de 10⁻¹². Se tomaron 10 µL de las últimas tres diluciones y se agregaron a 990 µL de un cultivo de *E. coli* XL1-Blue MRF' a una densidad óptica de 0.6 leída a 600 nm (para el cálculo final se consideró esta dilución, es decir, 10⁻² sería 10⁻⁴). La mezcla de células y fagos se incubó durante 30 minutos a 37°C sin agitación y después a 30 minutos a 37°C con agitación. Volúmenes de 10 µL de cada cultivo se sembraron en cajas de Petri con medio LB sólido con 100 µg/mL de ampicilina y se incubaron a 37°C durante 12 horas. Las colonias se contaron y se obtuvo el número de transformantes con la relación:

$$\text{Ufc/mL} = (\text{Número de colonias/mL}) * (\text{factor de dilución})$$

Tamizaje de la biblioteca de anticuerpos de llama (*Lama glama*) desplegados en fagos

El antígeno contra el que se realizó la selección de la biblioteca se inmovilizó en un inmunotubo ó en un pozo de ELISA cubierto con streptavidina (Thermo Scientific) durante 12 horas a 4°C. Dependiendo de la ronda de selección, el antígeno consistió en 1 mL de solución a 0.08 µg/µL de la toxina Cry3Aa ó 100 µL de una solución a 0.001 µg/µL del péptido sintético del asa 1 del dominio II de la toxina Cry3Aa. Ambas soluciones se hicieron en PBS 1x.

El excedente de antígeno se eliminó con tres lavados con PBS 1x. Dependiendo de la ronda de selección, el inmunotubo se bloqueó con una solución de leche descremada al 1% en PBS-T ó con una solución al 1% de BSA (Roche) en PBS-T.

Los fagos desplegando los anticuerpos de llama (obtenidos del rescate de la biblioteca) se agregaron al tubo en un volumen de 500 µL.

El tubo se incubó por 30 minutos con agitación y después 90 minutos sin agitación a TA. Se lavó 20 veces con PBS-Tween 0.1% y 20 veces con PBS 1x. Al tubo se agregó 1 mL de un cultivo de *E. coli* XL1-Blue MRF' a una densidad óptica de 0.7-1.0 medida a 600 nm. Se incubó a 37°C por 30 minutos sin agitación y luego por 30 minutos a 37°C con agitación. Se tomaron 1 µL y 100 µL del cultivo y se sembraron en cajas de Petri con medio 2xTY con 200 µg/mL de ampicilina, 15 µg/mL de tetraciclina y 1% de glucosa para determinar el título de salida de la ronda de selección. El resto del cultivo se sembró en cajas de 20 x 20 cm con medio 2xTY con 200 µg/mL de ampicilina, 15 µg/mL de tetraciclina y 1% de glucosa. Las cajas se incubaron durante 12 horas a 37°C. Las colonias se rasparon de la superficie del medio y se mezclaron con 2 mL de medio 2xTY con 200 µg/mL de ampicilina, 15 µg/ mL de tetraciclina y glicerol al 15%. El homogenado celular resultante se almacenó a -70°C hasta su utilización.

Reclonación de la biblioteca de anticuerpos de llama

Se utilizaron 10 μ L del homogenado celular resultante de cada ronda de selección para inocular 10 mL de medio 2xTY con 200 μ g/mL de ampicilina, 15 μ g/ mL de tetraciclina y glucosa al 1%. El cultivo se incubó a 37 °C con agitación durante 4-8 horas. Del cultivo se extrajo ADN plasmídico utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep Kit de QIAGEN. El ADN plasmídico se utilizó como templado para la amplificación de los genes de anticuerpos de llama. La mezcla de reacción consistió en: 2 μ L de amortiguador 10 x, 2 μ L de MgCl₂ (50 mM) 10 pmoles del iniciador pSyn1 (5'-ATA-CCT-ATT-GCC-TAC-GGC-3') 10 pmoles del iniciador pSyn2 (5'-TTT-CAA-CAG-TCT-ATG-CGG-3'), 2 μ L de dNTPs (10 mM c/u), 0.1 μ L de templado y 2.5 U de Taq ADN polimerasa (todos los reactivos de Altaenzymes) en un volumen final de 20 μ L.

Los genes de anticuerpos se digirieron con las enzimas de restricción SfiI y NotI. Los fragmentos se clonaron en el vector pSyn2 y la construcción se electroporó en la cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF'. Para electroporar se agregaron 2 μ L de ADN a 100 μ L de células electrocompetentes de *E. coli* XL1-Blue MRF' y se incubaron por 5 minutos a 4°C. A la mezcla de ADN y células se le aplicó un pulso de 250 mA, 25 μ Fa y 100 Ω y se incubó en medio SOC durante 1 hora a 37 °C con agitación. Las células transformadas se sembraron en cajas de 20 x 20 cm con medio 2xTY con 200 μ g/mL de ampicilina y 5 μ g/mL de tetraciclina. Las cajas se incubaron por 12 horas a 37 °C. Las colonias se rasparon y con ellas se obtuvo un homogenado que se utilizó para obtener fagos desplegando anticuerpos mediante la metodología utilizada para el rescate de la biblioteca.

Análisis de la capacidad de los fagos desplegando anticuerpos para unirse a la toxina Cry3Aa mediante ELISA.

Placas de cultivo de 96 pozos (Thermo Scientific) se llenaron con 100 μL de medio 2xTY con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina y glucosa al 1% por pozo. Cada pozo se inoculó con una colonia (obtenidas de las rondas selección) y se incubaron durante 12 horas a 37°C con agitación. Se iniciaron nuevos cultivos al utilizar 2 μL de los cultivos anteriores para inocular 200 μL de medio 2xTY con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina y glucosa al 1%. Los cultivos se incubaron a 37 °C con agitación durante 1 hora. Cada cultivo se infectó con 1×10^9 ufp de fagos M13 diluidos en 25 μL de medio 2xTY. Los cultivos infectados se incubaron durante 30 minutos a 37°C sin agitación y 30 minutos y después a 37°C con agitación. Las células se recuperaron por centrifugación durante 10 minutos a 1,800 x g. Las pastillas celulares se resuspendieron en 200 μL de medio 2xTY con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina y 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina para iniciar nuevos cultivos. Los cultivos se incubaron por 12 horas a 30°C con agitación.

Después de la incubación, los cultivos se centrifugaron por 10 minutos a 1,800 x g y los sobrenadantes que contenían fagos desplegando anticuerpos se recuperaron.

Previamente se adhirieron 2 μg de la toxina Cry3Aa por pozo en placas de ELISA durante 12 horas a 4°C. El exceso de toxina se eliminó mediante tres lavados con PBS 1x. Las placas se bloquearon con 200 μL de leche al 2% en PBS-T durante 2 horas a 37°C. El exceso de leche se eliminó mediante tres lavados con PBS 1x. A cada pozo se agregaron 50 μL del sobrenadante de uno de los cultivos en placas de ELISA (que contenían fagos desplegando anticuerpos) y se incubaron a 37°C por 1 hora. Los fagos no unidos se eliminaron mediante tres lavados con PBS-T y tres veces con PBS 1x. Se agregaron 100 μL por pozo del anticuerpo primario anti-M13 (Thermo Scientific) a una dilución 1:10,000 y las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C. El exceso de anticuerpo se eliminó mediante tres lavados con PBS-T y tres lavados con PBS 1x. Se agregaron 100 μL del anticuerpo secundario anti ratón acoplado a peroxidasa (Zymed) a una dilución 1:10,000 y las placas se incubaron a 37°C por 1 hora. El exceso de anticuerpo se eliminó mediante tres lavados con PBS-T y tres lavados con PBS 1x. El ensayo de ELISA se reveló con 100 μL de una solución de OPD en buffer de fosfato de sodio (0.1 M, pH 5). La absorbancia se leyó a 490 nm.

Análisis de las colonias resultantes de la selección mediante PCR.

Cada colonia resultante de las rondas de selección se solubilizó en 50 μL de agua destilada estéril. Se utilizaron 2 μL de la colonia solubilizada como templado para cada reacción de PCR.

La mezcla de PCR consistió en 2 μL de amortiguador 10x, 2 μL de MgCl_2 (50 mM) 10 pmoles del iniciador pSyn1 (5'-ATA-CCT-ATT-GCC-TAC-GGC-3') 10 pmoles del iniciador pSyn2 (5'-TTT-CAA-CAG-TCT-ATG-CGG-3'), 2 μL de dNTPs (10 mM c/u), 2 μL de templado y 2.5 U de Taq ADN polimerasa (todos los reactivos de Altaenzymes) en un volumen final de 20 μL .

Las condiciones de reacción fueron: 94°C por 5 minutos; 30 ciclos consistentes de 94°C por 30 segundos, 55°C por 40 segundos, 72°C por 40 segundos y finalmente 5 minutos a 72°C. Las reacciones se analizaron en geles de agarosa al 1%.

Inducción de la producción de anticuerpos.

Placas de ELISA de 96 pozos se llenaron con 100 μL por pozo de medio 2xTY con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina y glucosa al 2%. Cada pozo se inoculó con una de las colonias seleccionadas. Los cultivos se incubaron en agitación a 37°C durante 12 horas. Se utilizaron 2 μL de estos cultivos para inocular 100 μL de medio 2xTY con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina y glucosa al 0.1%. Los cultivos nuevos se incubaron en agitación a 37°C durante 12 horas. Los cultivos se centrifugaron a 1,800 x g durante 10 minutos y los sobrenadantes se desecharon. Las células se resuspendieron en 100 μL de medio 2xTY con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e IPTG al 0.1% y se incubaron en agitación a 37°C durante 12 horas. Muestras de 10 μL de cada cultivo se resolvieron por SDS-PAGE y se analizaron por Western blot.

Expresión y purificación de proteínas recombinantes en *E. coli*

Se inocularon 5 mL de medio 2xTY con ampicilina 100 µg/mL y glucosa al 2% con una colonia transformada con el plásmido conteniendo la proteína a expresar (anticuerpo, fragmento de caderina ó tioredoxina). El precultivo se incubó durante 12 horas en agitación a 37°C. Un volumen de 50 mL de medio 2xTY con ampicilina 100 µg/mL y glucosa al 0.1 % se inoculó con 500 µL del precultivo. El cultivo se incubó en agitación a 37 °C hasta que alcanzó una OD₆₀₀ de 0.6-0.7.

La expresión de la proteína recombinante se indujo por adición de IPTG hasta una concentración final de 0.1 mM. El cultivo inducido se incubó en agitación a 37 °C durante 4 horas. El paquete celular se recuperó por centrifugación a 8,500 x g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se desechó. El paquete celular se solubilizó en amortiguador de urea 8 M. Las células se disgregaron mediante sonicación. Se aplicaron tres pulsos de 1 minuto al 100% de intensidad cada pulso con un sonicador Ultrasonic Processor GEX 130PB de Cole-Palmer®. La solución se centrifugó a 6,200 x g durante 20 minutos. El sobrenadante se recuperó y la pastilla se desechó. Las proteínas recombinantes se purificaron a partir del sobrenadante mediante IMAC (Immobilized metal ion affinity chromatography). Para dicha cromatografía se empleó una columna de níquel-agarosa (QIAGEN) y una solución de 250 mM de Imidazol en PBS 1x como eluyente. Las proteínas purificadas se dializaron en PBS 1x y se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

Mutación sitio-dirigida

A la toxina Cry3Aa se le insertaron las mutaciones R345A, Y350F y Y351F. Las mutaciones se insertaron mediante PCR mutagénica utilizando el kit QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). El templado para las reacciones de PCR consistió en el gen de la toxina Cry3Aa clonado en el vector pHT315. Las mezclas de PCR consistieron de: 2.5 µL de amortiguador de reacción, 0.75 µL de Quick solution, 150 ng de templado, 12 pmol del oligonucleótido mutagénico, 1 µL de dNTPs y 1.0 µL de Quick enzyme en un volumen de reacción de 25 µL.

El ciclo de PCR consistió de 1 ciclo de 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 65°C por 15 minutos y un ciclo final a 65°C por 10 minutos. El producto de PCR se trató con la enzima Dpn I siguiendo las indicaciones del fabricante.

El ADN resultante se purificó con el kit de limpieza para productos de PCR "DNA PCR clean up kit" de Zymo Research. El ADN limpio se circularizó utilizando la enzima ligasa de ADN (Fermentas). La mezcla de ligación consistió de 5 µL de ADN, 5 µL de amortiguador de ligación y 1 µL de enzima ligasa (todos los reactivos de Fermentas). El ADN religado se transformó mediante electroporación en la cepa DH5α de *E. coli* para su amplificación y secuenciación. A la toxina que contuvo las tres mutaciones se le denominó A1.

Producción de la mutante A1 de la toxina Cry3Aa.

El plásmido con el gen de la toxina A1 se transformó en la cepa de *E. coli* SC110. La cepa SC110 amplificó el plásmido que contenía a la toxina A1 sin metilarlo. Los plásmidos no metilados se purificaron y se transformaron en la cepa acristalífera de *B. thuringiensis* denominada 407- mediante electroporación. Para transformar células de *B. thuringiensis* se mezclaron 20 µL de ADN con 300 µL de células electrocompetentes durante 20 minutos a 10°C. La mezcla se sometió a un pulso eléctrico de 250 mA, 20 µF y 1000 Ω. Las células se recuperaron e incubaron en medio LB sin antibiótico durante 1 hora a 37°C. Dos alícuotas de 200 µL cada una se sembraron en cajas con medio LB adicionado con 10 µg/mL de eritromicina. De cada caja se tomaron 4 colonias al azar y se amplificaron en cajas con medio LB con 10 µg/mL de eritromicina.

A partir de los cultivos en cajas se extrajo ADN plasmídico y se secuenció. Todas las muestras secuenciadas contuvieron las tres mutaciones. Una de las clonas secuenciadas se amplificó en una caja con medio LB con 10 µg/mL de eritromicina y se utilizó para inocular cultivos líquidos. La toxina A1 se purificó a partir de los cultivos líquidos de manera idéntica a la toxina Cry3Aa.

Ensayos de ELISA

Para competir la interacción entre el anticuerpo V_{HH}A5 y la toxina Cry3Aa se utilizaron péptidos sintéticos de los CDRs del anticuerpo. Cada pozo se llenó con 100 µL de una solución 0.01 µg/µL de toxina Cry3Aa en PBS 1x. Las placas se incubaron a 10°C durante 12 horas. El exceso de toxina Cry3Aa se eliminó mediante tres lavados con PBS 1x. Los pozos se bloquearon con una solución de BSA al 2% en PBS-T durante 2 horas a 37°C. El exceso de BSA se eliminó con tres lavados con PBS 1x.

Se prepararon tres soluciones, cada una conteniendo 40 nM del anticuerpo V_{HH}A5 y 40 µM de uno de los péptidos de los CDRs. Antes de agregarse a los pozos de ELISA, las mezclas del anticuerpo V_{HH}A5 y los péptidos de los CDRs se incubaron a TA durante 2 horas. Las mezclas del anticuerpo V_{HH}A5 y los péptidos de los CDRs se agregaron a los pozos de ELISA. Las placas de ELISA se incubaron a 37 °C durante 2 horas. El anticuerpo no unido se eliminó con tres lavados con PBS 1x.

A cada pozo se agregaron 100 µL del anticuerpo primario anti-6-histidinas (Amersham) a una dilución 1:2,500 en PBS-T. Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora. El exceso de anticuerpo se eliminó con tres lavados con PBS-T y tres lavados con PBS 1x. A cada pozo se agregaron 100 µL del anticuerpo secundario anti ratón acoplado a peroxidasa (Sta. Cruz Biotechnology) a una dilución 1:5,000 en PBS-T. Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora. El exceso de anticuerpo se eliminó con tres lavados con PBS-T y tres lavados con PBS 1x. El ensayo se reveló con 100 µL de una solución de OPD en buffer de fosfato de sodio (0.1 M, pH 5). La reacción se detuvo con 50 µL de H₂SO₄ 1N y la absorbancia se leyó a 490 nm.

Para los ensayos de interacción entre la toxina Cry3Aa ó la toxina A1 con las VMMA de *T. molitor* se utilizó 1 µg de VMMA por pozo. Cada pozo se llenó con 100 µL de una solución a 0.01 µg/µL de VMMA en PBS 1x y se incubó a 10 °C durante 12 horas. Las proteínas no adheridas se eliminaron mediante tres lavados con PBS 1x. Los pozos se bloquearon con una solución de BSA (Roche) al 2% en PBS-T durante 2 horas a 37 °C.

El exceso de BSA se eliminó con tres lavados con PBS 1x. A cada pozo se agregaron 100 µL de la toxina Cry3Aa ó A1 marcadas con biotina (Cry3Aa* ó A1*) diluidas en amortiguador de boratos. Las toxinas Cry3Aa* ó A1* se agregaron en concentraciones de 0, 3.9, 7.8, 15.6, 31.25, 62.5, 125 y 250 nM. Las placas de ELISA con las toxinas se incubaron durante 2 horas a 37 °C. El exceso de toxina se eliminó con tres lavados con PBS-T y tres lavados con PBS 1x.

A cada pozo se agregaron 100 µL de una solución de streptavidina acoplada a peroxidasa (Millipore) diluida en una proporción 1:5,000 en PBS-T. Las placas se incubaron a 37 °C por 1 hora. El exceso de streptavidina-peroxidasa se eliminó con tres lavados con PBS-T y tres lavados con PBS 1x. El ensayo se reveló con 100 µL de una solución de OPD en buffer de fosfato de sodio (0.1 M, pH 5). La reacción se detuvo con 50 µL de H₂SO₄ 1N y la absorbancia se leyó a 490 nm.

Para competir la interacción de la toxina Cry3Aa y las VMMA de *T. molitor* con el anticuerpo V_{HH}A5, el fragmento CR12, el anticuerpo V_{HH}P32 ó la tiorredoxina, se fijó 1 µg de VMMA a cada pozo de ELISA. Cada pozo se llenó con 100 µL de una solución a 0.01 µg/µL de VMMA en PBS 1x y se incubó a 10°C durante 12 horas. Las placas se lavaron tres veces con PBS 1x. Los pozos se bloquearon con una solución de BSA al 2% en PBS-T durante 2 horas a 37°C. Las placas se lavaron tres veces con PBS 1x. Antes de agregarse a los pozos de ELISA, la toxina Cry3Aa ó A1 marcadas con biotina (Cry3Aa* ó A1*) a una concentración de 10 nM en PBS 1x, se mezclaron con los excesos molares del competidor (anticuerpo V_{HH}A5, fragmento CR12, anticuerpo V_{HH}P32 ó tiorredoxina). Se utilizaron 125, 250 y 500 excesos molares de los competidores.

Las mezclas de las toxinas Cry3Aa* ó A1* y los competidores se incubaron a TA durante 2 horas. Las mezclas de las toxinas Cry3Aa* ó A1* y los competidores se agregaron a los pozos de ELISA. Las placas de ELISA se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T y tres veces con PBS 1x.

A cada pozo se agregaron 100 µL de una solución de streptavidina acoplada a peroxidasa (Millipore) diluida en una proporción 1:5,000 en PBS-T. Las placas se incubaron a 37 °C por 1 hora. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T y tres veces con PBS 1x. El ensayo se reveló con 100 µL de una solución de OPD en buffer de fosfato de sodio (0.1 M, pH 5). La reacción se detuvo con 50 µL de H₂SO₄ 1N y la absorbancia se leyó a 490 nm.

En el caso de la competencia entre el anticuerpo V_{HH}A5 y el fragmento CR12 se fijó 1 µg de uno de los ligandos (V_{HH}A5 ó CR12) a los pozos de ELISA. Las placas se incubaron a 10°C durante 12 horas. Las placas se lavaron tres veces con PBS 1x. Los pozos se bloquearon con 100 µL de una solución de BSA al 2% en PBS 1x. El exceso de BSA se eliminó mediante tres lavados con PBS 1x.

Antes de agregarse a los pozos de ELISA, la toxina Cry3Aa marcada con biotina se incubó con el competidor. Para competir la interacción con el anticuerpo V_{HH}A5, la toxina Cry3Aa marcada con biotina (Cry3Aa*) se incubó con el fragmento CR12. Para competir la interacción con el fragmento CR12, la toxina Cry3Aa* se incubó con el anticuerpo V_{HH}A5.

Las mezclas de toxina Cry3Aa* y el competidor se agregaron a los pozos de ELISA en volúmenes de 100 µL. Las placas se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T y tres veces con PBS 1x. A cada pozo se agregaron 100 µL de una solución de streptavidina-peroxidasa (Millipore) a una dilución 1:2,500 en PBS-T. Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T y tres veces con PBS 1x.

El ensayo se reveló con 100 µL de una solución de OPD en buffer de fosfato de sodio (0.1 M, pH 5). La reacción se detuvo con 50 µL de H₂SO₄ 1N y la absorbancia se leyó a 490 nm.

Para los experimentos de interacción entre las toxinas Cry3Aa y A1 con el anticuerpo V_{HH}A5 y el fragmento CR12, se fijaron cantidades de 1 µg del anticuerpo V_{HH}A5 ó el fragmento CR12 a los pozos de ELISA. Para fijar los antígenos, los pozos se llenaron con 100 µL de una solución a 0.01 µg/µL de V_{HH}A5 ó CR12 en PBS 1x.

Las placas se incubaron a 10 °C durante 12 horas. El exceso de antígeno se eliminó con tres lavados con PBS 1x. Los pozos se bloquearon con 100 µL de una solución de BSA al 2% en PBS 1x. Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora. El exceso de BSA se eliminó con tres lavados con PBS 1x. Las toxinas Cry3Aa ó A1 marcadas con biotina (Cry3Aa* ó A1*) se agregaron en volúmenes de 100 µL por pozo. Las toxinas Cry3Aa* ó A1* se utilizaron en concentraciones de 1.9, 3.9, 7.8, 15.6, 31.25, 62.5 y 125 nM. Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora. El exceso de toxinas se eliminó con tres lavados con PBS-T y tres lavados con PBS 1x.

A cada pozo se agregaron 100 µL de una solución de streptavidina peroxidasa (Millipore) a una dilución 1:2,500 en PBS-T. Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora y se lavaron tres veces con PBS-T y tres veces con PBS 1x. El ensayo se reveló con 100 µL de una solución de OPD en buffer de fosfato de sodio (0.1 M, pH 5). La reacción se detuvo con 50 µL de H₂SO₄ 1N y la absorbancia se leyó a 490 nm.

RESULTADOS

La interacción entre la toxina Cry3Aa y VMMA de *T. molitor* es específica y dependiente de proteínas ancladas por GPI

La interacción entre la toxina Cry3Aa y las proteínas de membrana de las células intestinales de *T. molitor* se analizó mediante ensayos de unión en solución tipo Bosch. Se prepararon vesículas a partir de células de la microvellosidad media apical de intestinos (VMMA) de larvas de estadios tempranos (1° - 2° estadio). Las vesículas se incubaron con cantidades crecientes de la toxina Cry3Aa marcada con biotina. La fracción de toxina Cry3Aa que se unió a las vesículas se detectó mediante un ensayo de Western-blot de acuerdo a lo detallado en materiales y métodos (Figura 7).

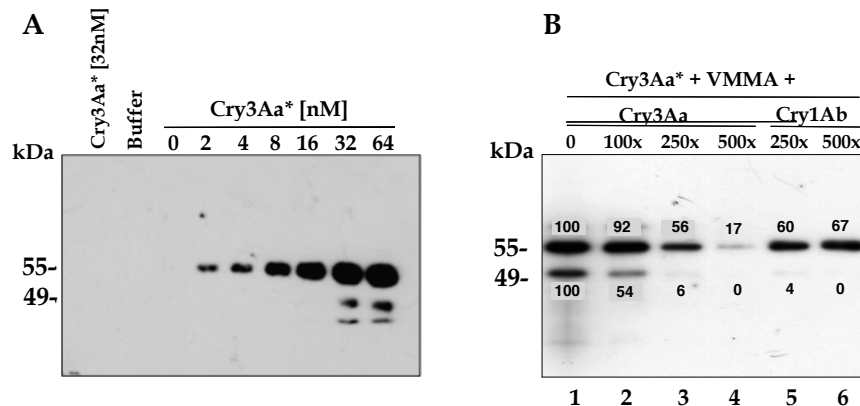


Figura 7. La unión entre la toxina Cry3Aa y las VMMA de *T. molitor* es específica. **A.** Ensayos de unión tipo Bosch entre VMMA de *T. molitor* y concentraciones crecientes de la toxina Cry3Aa marcada con biotina (Cry3Aa*). Los primeros dos carriles corresponden a controles de precipitación, el primero a la toxina sin vesículas y el segundo al amortiguador de unión. **B.** Competencia de la interacción entre la toxina Cry3Aa* (2.5 nM) y VMMA de *T. molitor* (10 µg) (línea 1), en presencia de excesos molares de la toxina Cry3Aa sin marcar (líneas 2-4) y de la toxina Cry1Ab sin marcar (líneas 5 y 6). Los números en las bandas corresponden a los valores de densitometría de cada resultado analizado con el programa GelAnalyzer210a (GelAnalyzer.com). Las imágenes son representativas de al menos 3 repeticiones.

Como se muestra en la figura 7A, la unión de la toxina Cry3Aa a las vesículas se incrementó conforme se adicionó una mayor cantidad de toxina. La interacción se saturó con 32 nM de toxina marcada. Para probar si es específica, la interacción entre la toxina Cry3Aa y las vesículas se compitió con excesos molares de la toxina Cry3Aa sin marcar (competencia homóloga) y con excesos molares de la toxina Cry1Ab sin marcar (competencia heteróloga).

En la competencia homóloga, la unión entre la toxina Cry3Aa biotinada y las vesículas comenzó a disminuir cuando se adicionaron 100 excesos de la toxina sin marcar y prácticamente se abatió con 500 excesos (Figura 7B). La toxina Cry1Ab, que no es tóxica contra coleópteros, no disminuyó la unión de la toxina Cry3Aa biotinada con las vesículas de la forma en que lo hizo la toxina Cry3Aa. La unión en presencia de la toxina Cry1Ab fue ligeramente menor a la unión sin competidor, pero no hubo diferencia entre la menor (250 excesos) y la mayor cantidad de competidor (500 excesos). La competencia observada al utilizar la toxina Cry1Ab puede deberse a interacciones inespecíficas. Es posible que la toxina Cry1Ab se una a los lípidos ó a proteínas con las que la toxina Cry3Aa no interacciona.

A continuación se analizó la contribución de las proteínas ancladas por GPI a la interacción de la toxina Cry3Aa con las VMMA de *T. molitor*.

Las VMMA, enriquecidas en proteínas de membrana, se trataron con la enzima fosfolipasa C (PLPC) de *Bacillus cereus*, la cual corta específicamente los anclajes de GPI. Después de la incubación con la enzima, las vesículas se lavaron para eliminar las proteínas ancladas por GPI sin afectar al resto. Con las vesículas tratadas con PLPC se realizaron ensayos de unión en solución a la toxina Cry3Aa. El resultado se comparó con la unión a las vesículas no tratadas con PLPC (Figura 8).

Como se muestra en la figura 8, las vesículas tratadas con PLPC perdieron aproximadamente el 40% de su capacidad de unión a la toxina Cry3Aa, lo que indicó que las proteínas ancladas por GPI contribuyen a la interacción entre las VMMA de *T. molitor* y la toxina Cry3Aa.

La capacidad de unión de las vesículas no se abatió por completo debido al tratamiento con PLPC, pero esto era lo esperado (Figura 8). Por una parte, el tratamiento con PLP-C no es 100% efectivo en cortar los enlaces de GPI. Por otra parte, existen muchos otros factores que contribuyen a la unión, además de las proteínas ancladas por GPI. Entre estos están las proteínas que no tienen anclaje de GPI y que participan en la interacción entre las VMMA y la toxina Cry3Aa. Para tratar de identificar a estas proteínas se realizaron ensayos de unión a ligando.

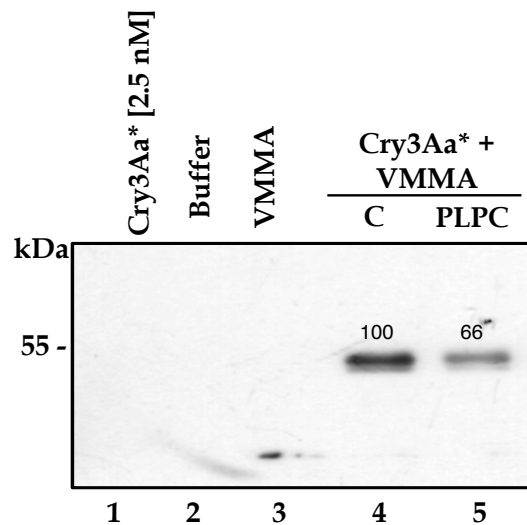


Figura 8. La interacción de la toxina Cry3Aa con VMMA de *T. molitor* depende de las proteínas ancladas por GPI. Ensayos de unión en solución tipo Bosch entre una concentración 2.5 nM de la toxina Cry3Aa marcada con biotina (Cry3Aa*) y 10 µg de VMMA de *T. molitor*. En el carril 4, unión de 2.5 nM de Cry3Aa* a 10 µg de VMMA de *T. molitor* completas ("C"). En el carril 5, unión de 2.5 nM de Cry3Aa* a 10 µg de VMMA disminuidas en proteínas ancladas por GPI mediante tratamiento con fosfolipasa C ("PLPC"). Los tres primeros carriles corresponden a controles de precipitación y consisten en: la toxina marcada sin vesículas (1), el amortiguador de unión (2) y las vesículas sin toxina (3). La figura es representativa de al menos 3 repeticiones. Los números en las bandas corresponden a los valores de densitometría de cada resultado analizado con el programa GelAnalyzer210a (GelAnalyzer.com)

En los ensayos de unión a ligando se resolvieron VMMA de *T. molitor* por medio de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Con dicha membrana se realizaron ensayos de unión a ligando incubándola con una solución de la toxina Cry3Aa marcada con biotina (Figura 9).

Para distinguir a las bandas correspondientes a las proteínas ancladas por GPI de aquellas no ancladas, también se realizó un ensayo de unión a ligando con una muestra enriquecida en proteínas ancladas por GPI. Esta muestra se obtuvo al tratar vesículas con PLPC y recuperar el sobrenadante después de centrifugar. Al cortar el anclaje de GPI, las proteínas quedarían en la fracción soluble. Además, se realizó un ensayo de unión a ligando con las VMMA completas omitiendo la toxina Cry3Aa biotinada. La membrana con las proteínas de las VMMA se incubó solamente con la solución de streptavidina acoplada a peroxidasa. Esto con el propósito de detectar a las proteínas biotinadas naturalmente que podrían encontrarse en las células intestinales de *T. molitor*.

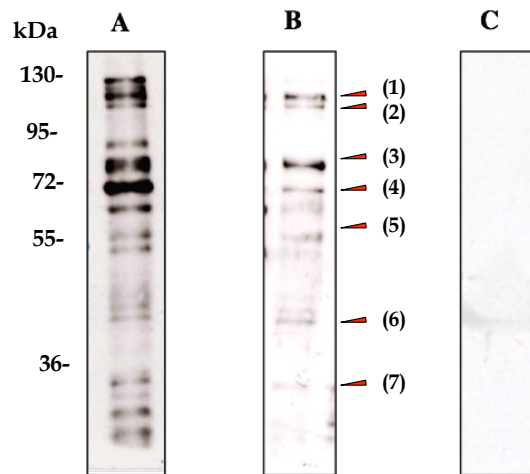


Figura 9. La toxina Cry3Aa se une a varias proteínas en las VMMA de *T. molitor*. Los ensayos de unión a ligando se realizaron resolviendo 10 μg de VMMA completas (A, C) y 10 μg de la fracción enriquecida en proteínas ancladas por GPI (B). Las membranas a las que se transfirieron las proteínas resueltas se incubaron con una solución 10 nM de toxina Cry3Aa marcada con biotina (paneles A, B). La toxina Cry3Aa biotinada que se unió a las proteínas resueltas se detectó con streptavidina peroxidasa. En el panel C se omitió la toxina Cry3Aa biotinada y la membrana se incubó solamente con la solución de streptavidina peroxidasa. En **B** solamente se señalan con flecha y número las posibles proteínas ancladas por GPI.

En la unión a las vesículas completas (Figura 9A) se observan 15 bandas, que podrían corresponder a proteínas de entre 28 y 120 kDa a las que la toxina Cry3Aa se une. En la unión a las proteínas ancladas por GPI (Figura 9B) se observan siete bandas a las que la toxina Cry3Aa se une. Estas bandas podrían corresponder a proteínas de tallas aproximadas de: 120 (1), 110 (2), 85 (3), 68 (4), 60 (5), 40 (6) y 30 (7) kDa respectivamente. En el control que no fue incubado con toxina marcada (Figura 9C) no se detecta ninguna señal, lo cual indica que no hay proteínas biotinadas naturalmente en el intestino de *T. molitor*.

En el intestino de *T. molitor* existen proteínas con actividad de fosfatasa alcalina ancladas por GPI

El experimento anterior muestra que algunas de las proteínas que se unen a la toxina Cry3Aa en el intestino de *T. molitor* están ancladas por GPI (Figura 9B). En el caso de los insectos lepidópteros se ha reportado que las proteínas ancladas por GPI como las APNs y las ALPs son importantes para la interacción con las toxinas Cry. Debido a estos antecedentes se decidió analizar si en *T. molitor* las proteínas ancladas por GPI interaccionan con la toxina Cry3Aa. El trabajo se enfocó en las proteínas tipo ALP y para identificarlas se realizaron ensayos de actividad en gel.

Para dichos ensayos, las vesículas se lavaron exhaustivamente, se mezclaron con amortiguador de carga no desnaturizante para que las enzimas conservaran su actividad y se resolvieron mediante SDS-PAGE. Una vez que las proteínas de las vesículas se resolvieron, el gel se incubó en una solución con el sustrato para la enzima fosfatasa alcalina (5-bromo-4-cloro-3-indol L fosfato). La incubación procedió hasta la aparición de bandas de precipitado violeta que indicaron la actividad de la enzima.

Además de las vesículas completas se incluyó una muestra enriquecida en proteínas ancladas por GPI, obtenida mediante tratamiento con PLPC como se detalló anteriormente (Figura 10A).

El ensayo de actividad en gel con las vesículas completas reveló que existe actividad de fosfatasa alcalina en el intestino de *T. molitor*. La actividad también se detectó en la muestra enriquecida en proteínas ancladas por GPI. Estas dos evidencias indican que en el intestino de *T. molitor* existen proteínas ancladas por GPI que tienen actividad de fosfatasa alcalina (Figura 10A).

En un trabajo previo se caracterizó la actividad de varios tipos de enzimas en *T. molitor* (Ferreira C. *et al.*, 1990). En este se reportó que la actividad de la fosfatasa ácida soluble es mucho mayor a la de la fosfatasa alcalina. Tomando en cuenta este antecedente, en nuestro trabajo se analizó si la actividad detectada en la muestra enriquecida en proteínas ancladas por GPI (Figura 10 A2) se debía a una fosfatasa alcalina o a un remanente de la fosfatasa ácida.

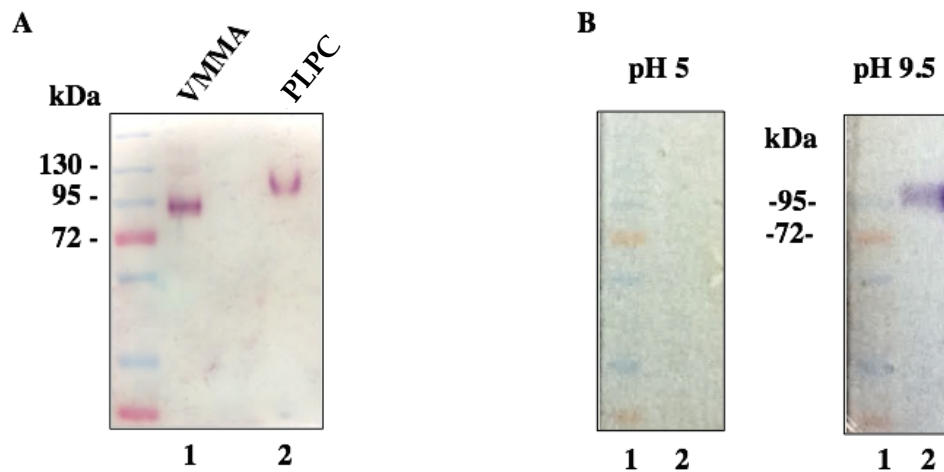


Figura 10. En el intestino de *T. molitor* existen proteínas con actividad de fosfatasa alcalina ancladas por GPI. Ensayos en gel de la actividad de fosfatasa alcalina. **A.** En el carril 1 se resolvieron 10 μ g de VMMA lavadas por centrifugación. En el carril 2 se resolvieron 30 μ L del sobrenadante obtenido al tratar 30 μ g de VMMA con PLPC. El gel resuelto se incubó en amortiguador alcalino. **B.** En cada gel se resolvieron 20 μ g de VMMA lavadas tres veces por centrifugación. El gel etiquetado como pH 5 se incubó en amortiguador ácido, mientras que el gel etiquetado como pH 9.5 se incubó en amortiguador alcalino. En los tres geles se utilizaron BCIP y NBT como sustratos de la enzima fosfatasa alcalina.

Para realizar este análisis, se resolvieron dos muestras de proteínas ancladas por GPI en sendos carriles de manera no desnaturizante, como se describió previamente. Una de las muestras se incubó en un amortiguador con pH alcalino, reportado como ideal para la actividad de la fosfatasa alcalina, mientras que el otro se incubó en condiciones de pH ácido, ideal para la actividad de la fosfatasa ácida y para inhibir la actividad de la fosfatasa alcalina (Ferreira C. *et al.*, 1990).

Como muestra la figura 10B, solo se obtuvo precipitado violeta en la muestra incubada en condiciones alcalinas, mientras que en la muestra incubada en condiciones ácidas no se observó actividad. Esto indica que la actividad es debida solamente a la fosfatasa alcalina.

Una vez probada la presencia de fosfatasa alcalina entre las proteínas ancladas por GPI de *T. molitor*, el siguiente paso fue analizar si esta proteína interacciona con la toxina Cry3Aa. Para esto se resolvieron dos muestras de proteínas ancladas por GPI, con una se realizó un ensayo de actividad y con la otra se realizó un ensayo de unión a ligando con la toxina Cry3Aa marcada con biotina (Figura 11).

Este experimento reveló que las proteínas contenidas en el precipitado violeta, que migran alrededor de los 120 kDa en condiciones semi-desnaturizantes, interaccionan con la toxina Cry3Aa. Además, el ensayo de unión también reveló a otras proteínas de alrededor de 60 kDa que interaccionan con la toxina Cry3Aa pero que no tienen actividad de fosfatasa alcalina (Figura 11A). Como muestra este experimento, el ensayo de actividad en gel puede utilizarse como un paso de purificación. Permite discriminar de entre las proteínas contenidas en las vesículas, a un grupo de proteínas que tienen actividad de fosfatasa alcalina y peso molecular similar.

Para analizar a este grupo de proteínas, la banda de precipitado violeta se cortó del gel y las proteínas se extrajeron de este. Para la extracción de las proteínas, el gel se maceró e incubó en agua destilada con agitación constante. Después de concentrarlas, las proteínas se separaron en dos muestras iguales y se resolvieron en un gel de manera desnaturizante. Una de las muestras se tiñó con plata y con la otra se realizó un ensayo de unión a ligando con la toxina Cry3Aa marcada con biotina (Figura 11B).

Como se muestra en la figura 11B, las proteínas del precipitado violeta migraron como dos bandas de aproximadamente 60 y 68 kDa. El ensayo de unión mostró que ambas bandas interaccionan con la toxina Cry3Aa. El tamaño de estas proteínas coincide con lo reportado previamente para fosfatasa alcalinas de insectos dípteros (Fernandez L. E. *et al.*, 2006), lepidóperos (Arenas I. *et al.*, 2010) y otros coleópteros (Martins E. S. *et al.*, 2010) con pesos moleculares de entre 60 y 68 kDa.

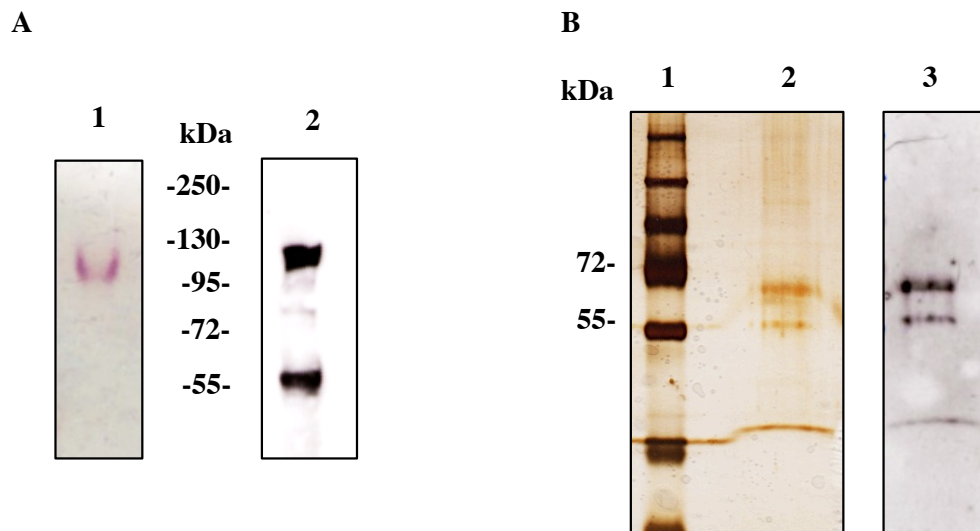


Figura 11. Las proteínas con actividad de fosfatasa alcalina se unen a la toxina Cry3Aa. **A.** En 1 y 2 se resolvió el sobrenadante obtenido (30 μ L) al tratar 30 μ g de VMMA con PLPC. En 1 se realizó un ensayo de actividad en gel. En 2 se realizó un ensayo de unión a ligando con 10 nM de la toxina Cry3Aa marcada con biotina. **B.** Las proteínas contenidas en el precipitado violeta como el mostrado en A1 se extrajeron del gel. Tras concentrarse, dichas proteínas se resolvieron de forma desnaturizante en dos carriles. Las proteínas del carril 1 se tiñeron con plata usado el kit "Pierce® Silver Stain Kit" de Thermo Scientific. Con las proteínas del carril 2 se realizó un ensayo de unión a ligando con 10 nM de la toxina Cry3Aa marcada con biotina.

Resultados

Previamente se reportó que la isoforma de fosfatasa alcalina de *M. sexta* que interacciona con la toxina Cry1Ab se expresa de manera diferencial a lo largo del desarrollo larvario (Arenas I. *et al.*, 2010). Considerando este antecedente, se decidió analizar si algo similar ocurre en *T. molitor*. Para hacerlo, se compararon los perfiles de interacción con la toxina Cry3Aa con vesículas purificadas a partir de larvas de diferentes estadios de desarrollo.

Debido al largo ciclo de desarrollo de *T. molitor*, de casi siete meses que comprenden 11 estadios larvarios, se utilizaron solamente dos grupos diferentes de larvas. El primero consistió de larvas entre el primer y el tercer estadio, en los que estas tienen un peso promedio de aproximadamente 5 mg/larva. El segundo grupo consistió de larvas en los últimos estadios, con un peso de aproximadamente 120-150 mg/larva (Figura 12A). Los perfiles obtenidos aunque similares tienen diferencias en cuanto a la nitidez de las bandas detectadas (Figura 12B).

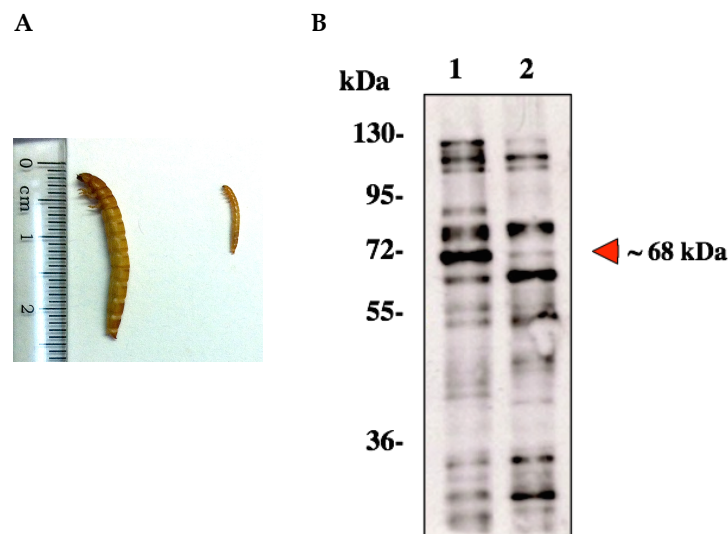


Figura 12. Comparación de la unión de la toxina Cry3Aa a vesículas de diferentes estadios de desarrollo. **A.** A la derecha se muestran las larvas de 1-3^{er} estadio de aproximadamente 5 mg/larva. A la izquierda las larvas de los últimos estadios pre-pupa de 120-150 mg/larva. **B.** Se resolvieron cantidades de 10 μ g de vesículas de los primeros estadios (carril 1) y los últimos estadios (carril 2). Con las proteínas resueltas se realizaron ensayos de unión a ligando con 10 nM de la toxina Cry3Aa marcada con biotina. La flecha en B señala a posición de la posible fosfatasa alcalina.

Mientras que proteínas como la de aproximadamente 120 kDa o la de 40 kDa prácticamente no varían entre estadios, la de aproximadamente 60 kDa se detecta mas intensamente en los estadios tardíos. La proteína de aproximadamente 68 kDa, cuya talla se asemeja a la proteína con actividad de fosfatasa alcalina de la figura 11, se detecta claramente en los estadios tempranos y muy tenuemente en los estadios tardíos. Si esta proteína es la fosfatasa alcalina, es posible que a medida que la larva se desarrolla, la expresión de esta proteína disminuya, de manera similar a lo reportado previamente para la fosfatasa alcalina de *M. sexta* (Arenas I. *et al.*, 2010)

Obtención de herramientas para el estudio de la interacción de la toxina Cry3Aa con sus receptores.

La interacción de las toxinas Cry con los receptores de las VMMA ha resultado útil para el entendimiento del funcionamiento de estas toxinas. Sin embargo, para propósitos de mejoramiento de la función y el entendimiento del mecanismo de acción, puede resultar más útil el conocer sus interacciones con receptores individuales.

La toxina Cry3Aa es un buen sujeto para experimentar con sistemas de mejoramiento dada su baja toxicidad natural. Sin embargo, a excepción del receptor tipo caderina de *T. molitor*, (Fabrick J. *et al.*, 2009) no se conocen secuencias de sus receptores.

Una alternativa para solventar esta carencia es aislar una molécula que interaccione con la toxina de manera similar a como lo hace un receptor, es decir que mimetice a un receptor. Esta estrategia se utilizó previamente al aislar, a partir de una biblioteca sintética de anticuerpos desplegados en fagos, a un anticuerpo que mimetiza al receptor Bt-R1 de *M. sexta* (Gomez I. *et al.*, 2001). Tomando en cuenta estos antecedentes, en el presente trabajo se utilizó una biblioteca de fragmentos V_{HH} de anticuerpos de llama (*Lama glama*) desplegados en fagos (Amaro Estrada I., 2007) para buscar un anticuerpo que mimetice a un receptor de la toxina Cry3Aa.

Se utilizó esta estrategia debido en primer lugar a las ventajas que ofrece la técnica de despliegue en fagos (phage display). Esta consiste en la expresión de polipéptidos en fusión con alguna de las proteínas de la capsida de un virus bacteriófago y en la construcción de una biblioteca de variantes de la proteína desplegada.

En la biblioteca se puede buscar a una molécula con características deseables mediante selección por afinidad (biopanning). Esta selección consiste en el enriquecimiento secuencial de un fago que despliega un anticuerpo que se une a un antígeno, mediante rondas de unión a este antígeno y lavados (Benhar I., 2001).

La razón por la que se utilizó una biblioteca de V_{HH} de llama desplegados en fagos fue por el tamaño de los anticuerpos. Los camélidos tienen la característica de producir, además de los IgGs convencionales, anticuerpos carentes de cadenas ligeras llamados "heavy chain" IgGs ó HCAb. El peso molecular de estos es de alrededor de 95 kDa y sus dominios de unión a antígeno están formados solamente por cadenas pesadas, a pesar de lo cual poseen un auténtico repertorio de unión a antígeno (Hamers-Casterman C. *et al.*, 1993). De los anticuerpos de camélidos se derivan los V_{HHS} , que consisten en el fragmento variable de la cadena pesada y comprenden el fragmento más pequeño conocido con capacidad de unión a antígeno (Harmsen M. M. y De Haard, H. J., 2007).

Para realizar la selección, inicialmente se purificaron fagos-anticuerpos de la biblioteca original. Se sometieron a una primera ronda de selección contra la toxina Cry3Aa en su forma activa (55 y 49 kDa) adherida a un inmunotubo y se recuperaron las clonas resultantes. Para evitar la propagación de clonas con copias truncas de los genes de anticuerpos, para la segunda y tercera ronda, los genes de aproximadamente 500 pb se obtuvieron mediante PCR. Para esta reacción se utilizó el ADN obtenido de las clonas de la ronda anterior. Los genes de anticuerpos así obtenidos se reclonaron en el vector pSyn2. Con las colonias resultantes de la transformación se produjeron nuevos fagos desplegando anticuerpos y estos se utilizaron en la siguiente ronda.

Resultados

En las primeras dos rondas de selección se utilizó a la toxina Cry3Aa activada. En la tercera ronda se utilizó un péptido sintético con la secuencia H-NHREFQPGYYGNDSFN-NH₂ correspondiente a la secuencia del asa 1 del dominio II de la toxina Cry3Aa. Las condiciones de cada ronda de selección se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones utilizadas para las rondas de selección de la biblioteca de anticuerpos de llama (ufc = unidades formadoras de colonias)

Ronda	Saturante	Antígeno	Título de entrada (ufc/mL)	Título de salida (ufc/mL)
1	Leche 1%	Toxina (80 µg)	1 x10 ¹¹	1 x10 ⁹
2	BSA 1%	Toxina (80 µg)	1 x10 ¹¹	1 x10 ⁴
3	Leche 1%	Asa1 (1 µg)	1 x10 ¹¹	1 x10 ³

A partir de las clonas resultantes de la tercera ronda se produjeron fagos desplegando anticuerpos. Mediante ensayos de ELISA se analizó la capacidad de estos fagos-anticuerpos para interactuar con la toxina Cry3Aa. En la figura 13 se muestra el resultado del análisis de 94 anticuerpos desplegados en fagos.

La elección de clonas que serían analizadas se realizó en base a dos controles del ensayo de ELISA. El primer control midió las interacciones no específicas de los anticuerpos desplegados en fagos. La interacción entre los anticuerpos desplegados en fagos y la leche utilizada para bloquear los pozos de ELISA resultó en una absorbancia de 0.047 (barra 84). El segundo control midió la detección no específica del anticuerpo primario. La interacción del anticuerpo anti-M13 con la toxina Cry3Aa resultó en una absorbancia de 0.054 (barra 96).

La mayoría de los anticuerpos desplegados en fagos probados generaron absorbancias de entre 0.1 y 0.4. Se asumió que los valores de absorbancia más cercanos a los obtenidos de los controles se debían a interacciones no específicas. Por lo tanto, todas las absorbancias superiores a las de estos dos controles se deberían a la interacción entre los anticuerpos desplegados en fagos y la toxina Cry3Aa. Por último se asumió que los fagos-anticuerpos que generaron valores mayores de absorbancia se unieron más eficazmente a la toxina Cry3Aa. Por ello, se eligió un valor de 0.4 como punto de corte.

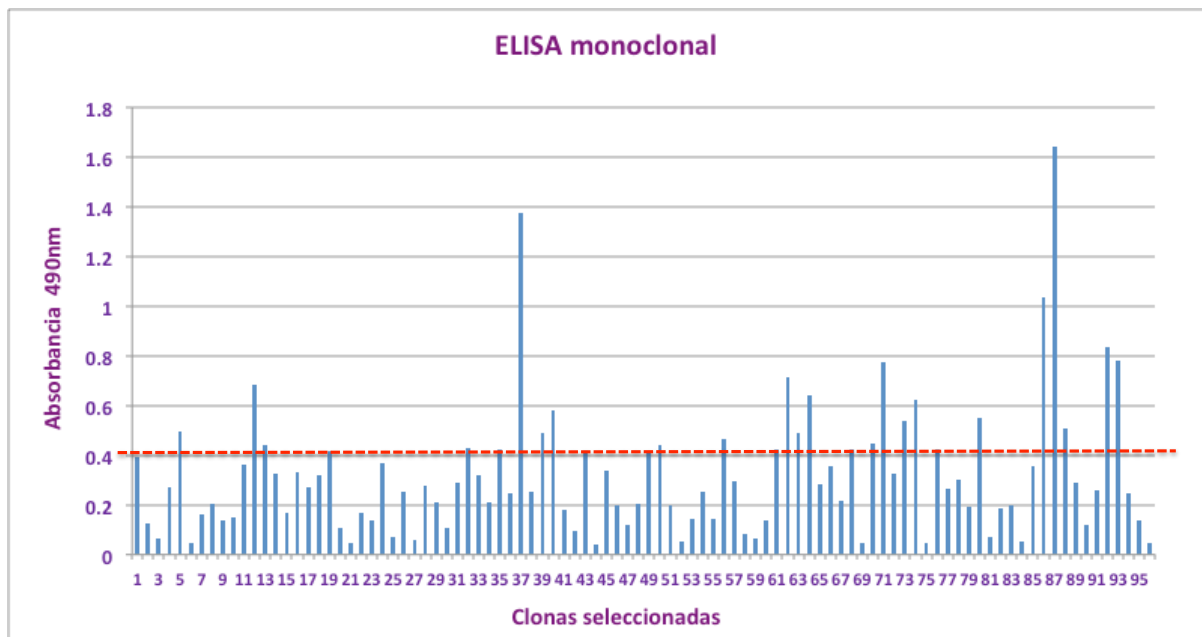


Figura 13. Análisis de la interacción entre los anticuerpos desplegados en fagos y la toxina Cry3Aa mediante ELISA. En cada pozo se fijaron 2 µg de la toxina Cry3Aa. Los fagos desplegando anticuerpos se incubaron con la toxina Cry3Aa fija en los pozos. Para detectar los fagos desplegando anticuerpos unidos a la toxina se utilizó un anticuerpo anti-M13 (Thermo Scientific) a una dilución 1:5,000 en PBS-T. El anticuerpo anti-M13 se detectó con un anticuerpo secundario anti-ratón (Zymed) a una dilución 1:10,000 en PBS-T. La línea roja indica el punto de corte establecido arbitrariamente en 0.4 unidades de absorbancia.

Las clonas que produjeron un fago-anticuerpo que generó una absorbancia mayor a 0.4 se analizaron. Para probar que las clonas seleccionadas tuvieran un gen completo de anticuerpo se realizó PCR de colonia. Para probar si las clonas seleccionadas podían producir el anticuerpo se realizaron pruebas de inducción con IPTG.

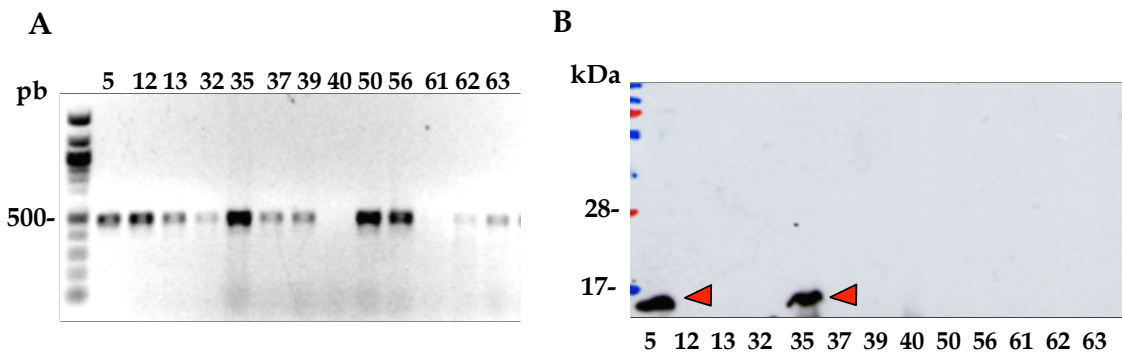


Figura 14. Análisis de clonas obtenidas de la tercera ronda de selección. **A.** Las clonas seleccionadas se analizaron mediante PCR de colonia. Se utilizaron los iniciadores pSyn1 y pSyn2 que se unen al final del gen de la secuencia señal PelB del vector pSyn2 y al inicio de la proteína III del fago respectivamente. Las clonas positivas generaron un fragmento de aproximadamente 500 pb. **B.** Con las clonas seleccionadas se realizó una prueba de inducción de la expresión del anticuerpo utilizando IPTG. Las clonas positivas generaron una proteína de aproximadamente 15 kDa. La proteína se detectó mediante ensayos de Western-blot utilizando un anticuerpo primario anti-c-Myc (Amersham) y un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa (Zymed). Las flechas rojas indican la ubicación del anticuerpo.

La mayoría de las clonas contuvieron el gen del tamaño esperado para un fragmento variable de anticuerpo de llama (V_{HH}), de aproximadamente 500 pb. Sin embargo solo en 4 de las 25 clonas analizadas se detectó la producción de un anticuerpo soluble, de tamaño alrededor de los 15 kDa (Dos mostradas en la figura 14). La estrategia de reclonación sirvió para disminuir la selección de copias de genes truncos. Sin embargo, la mayoría de las clonas seleccionadas no expresan el anticuerpo, lo expresan en muy baja cantidad o es inestable y se degrada rápidamente ya que no es posible detectarlo con los ensayos de Western blot.

Resultados

Las secuencias de las cuatro clonas en las que se detectó la expresión del anticuerpo resultaron idénticas por lo que esta se denominó V_{HH}A5 y se continuó su caracterización. La secuencia del anticuerpo V_{HH}A5 se comparó contra las secuencias depositadas en bases de datos de NCBI utilizando la herramienta BLAST®. Se encontró que la secuencia del anticuerpo V_{HH}A5 es más parecida a las regiones pesadas de anticuerpos humanos que a las de camélidos. Sin embargo, comparte características con anticuerpos de llama tales como la longitud de la proteína y la longitud del CDR3 (CDR del inglés complementarity determining region). El CDR3 es más largo en los anticuerpos de llama en comparación con los anticuerpos humanos o murinos (Figura 15A).

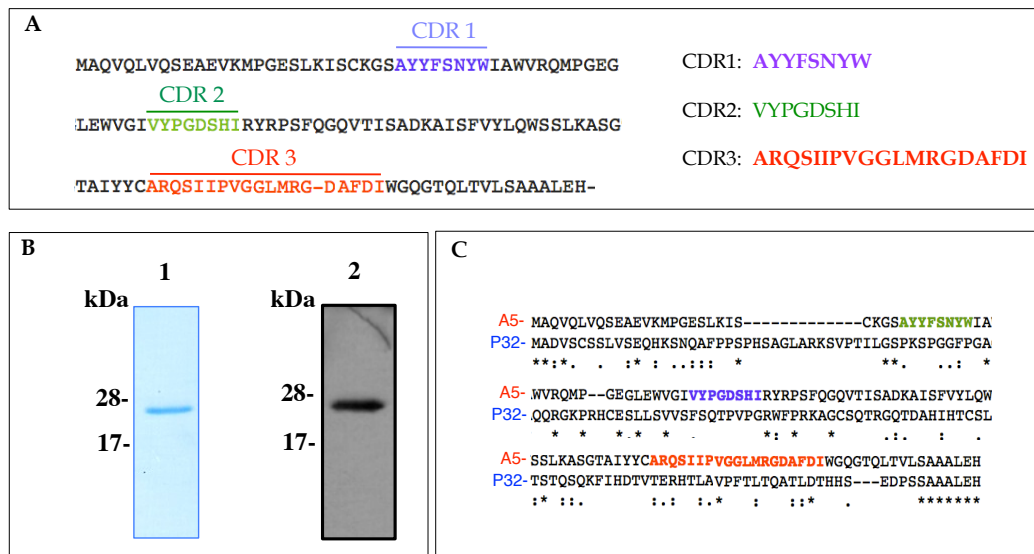


Figura 15. El anticuerpo V_{HH}A5 se aisló a partir de una biblioteca de anticuerpos de llama. **A.** El gen de anticuerpo de la clona A5 se secuenció. El análisis de la secuencia de ADN del anticuerpo V_{HH}A5 en el servidor IMGT (www.imgt.org) permitió localizar sus CDRs. **B.** El gen el anticuerpo V_{HH}A5 se fusionó a la tiorredoxina del vector pET32b. La fusión resultó en una proteína de aproximadamente 27 kDa. El panel 1 muestra la tinción con Coomassie de la fusión. El panel 2 muestra la detección de la fusión mediante Western blot con un anticuerpo anti-6 histidinas. **C.** A partir de la biblioteca original, sin ningún tipo de selección contra antígeno, se aisló una segunda secuencia de anticuerpo denominada V_{HH}P32. V_{HH}P32 se aisló para ser utilizado como control en subsiguientes experimentos en los que se utilizara al anticuerpo V_{HH}A5. Se muestra la comparación de secuencias entre los anticuerpo V_{HH}A5 y V_{HH}P32.

Una desventaja del anticuerpo V_{HH}A5 fue que cuando se expresó de forma soluble se obtuvieron rendimientos muy bajos, lo que dificultó su producción y caracterización. Para remediar esto, el gen del anticuerpo se clonó en el vector de expresión pET32b de Novagen, el cual produce una fusión entre la proteína clonada y la tiorredoxina. Esta estrategia se utiliza comúnmente para ayudar a la producción de proteínas recombinantes, ya que la tiorredoxina estabiliza el plegamiento de la fusión.

El resultado fue una fusión entre el anticuerpo V_{HH}A5 y la tiorredoxina, con un peso molecular total de aproximadamente 27 kDa que se produjo eficientemente (Figura 15B).

Para comparar la capacidad del anticuerpo V_{HH}A5 para unirse a la toxina Cry3Aa con la de un anticuerpo que no fue sometido a ningún proceso de selección, fue necesario aislar un segundo anticuerpo. A partir de la biblioteca original se aisló el anticuerpo V_{HH}P32. Su secuencia de ADN resultó aproximadamente 55 pb más extensa que la del anticuerpo V_{HH}A5 y solamente guardó un 17% de similitud de aminoácidos con este (Calculado con la herramienta SIAS: <http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>).

El anticuerpo V_{HH}P32 también se clonó en el vector pET32b para que al compararlo con el anticuerpo V_{HH}A5 se pudiera distinguir el efecto del anticuerpo sin la influencia de la tiorredoxina. La fusión entre el anticuerpo V_{HH}P32 y la tiorredoxina se expresó en *E. coli* produciendo una proteína de aproximadamente 24 kDa.

El análisis del anticuerpo V_{HH}A5 comenzó probando la importancia de sus regiones de interacción, es decir los CDRs. Para esto se realizaron ensayos de ELISA en presencia de péptidos sintéticos con las secuencias de los CDRs (Figura 16A).

Para analizar la influencia de cada CDR, la toxina Cry3Aa se adhirió a los pozos de ELISA y el anticuerpo V_{HH}A5 se incubó con 1000 excesos molares de cada CDR (el exceso se midió con respecto a la cantidad de anticuerpo). Con esto se esperaba que la región correspondiente al CDR en el anticuerpo V_{HH}A5 se bloqueara. El complejo anticuerpo-péptido sintético se incubó con la toxina adherida a los pozos de ELISA y la cantidad de anticuerpo capaz de unirse a la toxina se detectó mediante un anticuerpo anti-6 histidinas.

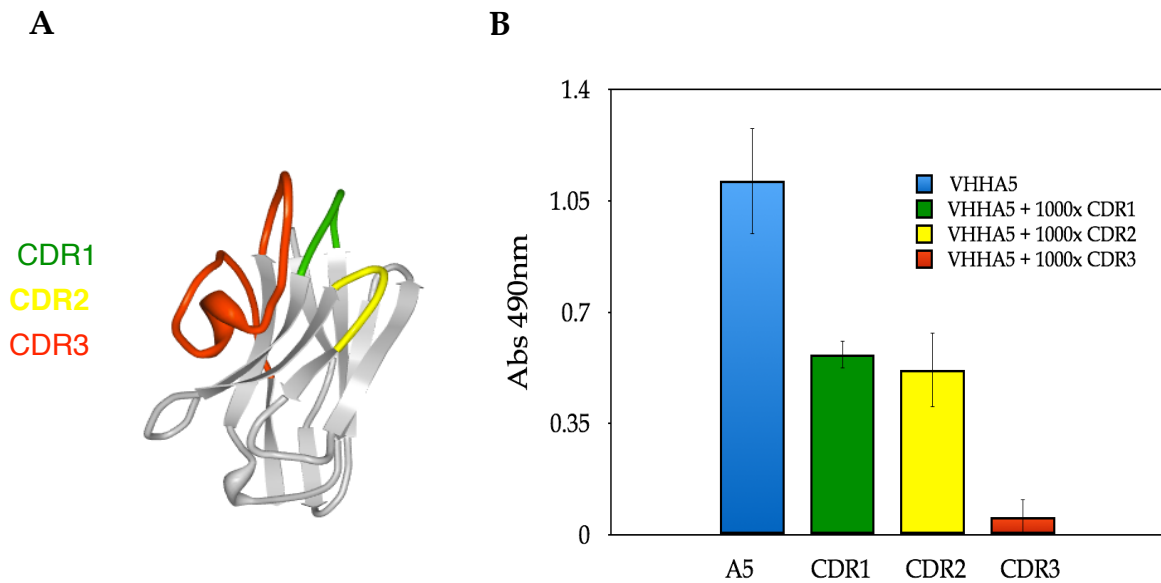


Figura 16. El CDR3 es el más importante para la interacción del anticuerpo V_{HHA5} con la toxina Cry3Aa. **A.** Modelo de anticuerpo de llama en el que se resalta la ubicación de cada CDR en la estructura. El modelo corresponde al anticuerpo D2-L29 (De Genst E. *et al.*, 2006)(PDB 1ZV5) y fue modificado con el programa Protein Workshop 3.9 (Moreland J. L. *et al.*, 2005) **B.** Competencia de la interacción entre la toxina Cry3Aa y el anticuerpo V_{HHA5} en presencia de 1000 excesos molares de péptidos sintéticos de cada CDR. La columna azul representa la interacción del anticuerpo V_{HHA5} con la toxina Cry3Aa sin competidor y las barras de error representan la desviación estándar de tres repeticiones.

Como se muestra en la figura 16 B, tanto el CDR1 como el CDR2 redujeron cada uno en aproximadamente 50% la interacción del anticuerpo V_{HHA5} con la toxina. Sin embargo, el efecto más notable fue el del péptido del CDR3 ya que su presencia redujo en aproximadamente un 80% dicha interacción (Figura 16B).

Este experimento demostró que es principalmente a través de las asas del anticuerpo V_{HHA5} que se da la interacción con la toxina Cry3Aa, minimizando la posibilidad de una interacción entre la tiorredoxina y la toxina.

Lo siguiente fue analizar la capacidad del anticuerpo V_{HHA5} para mimetizar a un receptor de la toxina Cry3Aa.

Análisis de la interacción de la toxina Cry3Aa y la mutante A1 con el anticuerpo V_{HH}A5 y el fragmento 12 de la caderina de *T. molitor*.

En un reporte previo se demostró que la toxina Cry3Aa con tres mutaciones puntuales y denominada A1 resultó 11 veces más tóxica contra *T. molitor*. Dos mutaciones se ubican en el asa 1 del dominio II de la toxina (Y350F, Y351F) y la tercera a tres aminoácidos de distancia del inicio del asa (R345A) (Wu S. J. *et al.*, 2000).

La mutante triple se construyó utilizando dos reacciones de PCR mutagénica consecutivas, la primera utilizando el oligonucleótido Cry3A1 (5'-CGA-CCA-GGA-TTC-TTC-GGA-AAT-GAC-3') y la segunda el oligonucleótido 3AMUT3 (5'-CAA-TTT-CAC-ACG-GCG-TTC-CAA-CCA-GGA-TTC-3'). Las mutaciones se insertaron en el gen de la toxina Cry3Aa clonado en el vector pHT315 (Arantes O. y Lereclus, D., 1991) generando la construcción pHT315-A1. El plásmido pHT315-A1 se transformó en la cepa acristalífera de *B. thuringiensis* 407-. De esta manera, se produjeron cristales a partir del plásmido que contenía al gen de la toxina A1. Los cristales se purificaron, solubilizaron y activaron de manera idéntica a la toxina Cry3Aa.

En primer lugar se analizó la interacción de las dos toxinas con la totalidad de las moléculas de unión encontradas en VMMA de *T. molitor* mediante ensayos de unión tipo Bosch. Como se muestra en la figura 17A, la toxina A1 se une más eficientemente a las vesículas ya que se observa unión desde una concentración de 5 nM de toxina, mientras que con la toxina Cry3Aa la unión comienza a detectarse con una concentración de 10 nM de toxina.

En el panel B de la figura 17 se muestran los valores de Kd aparente para la interacción de la toxina Cry3Aa y la toxina A1 con VMMA de *T. molitor*. Los valores se calcularon utilizando el método de Scatchard a partir de los datos de las curvas de unión obtenidos mediante ELISA. Los datos muestran que toxina A1 es más afín por las VMMA de *T. molitor* que la toxina Cry3Aa ya que su Kd aparente es de 32.6 nM, aproximadamente 4 veces menor que la Kd aparente de la toxina Cry3Aa de 111.7 nM.

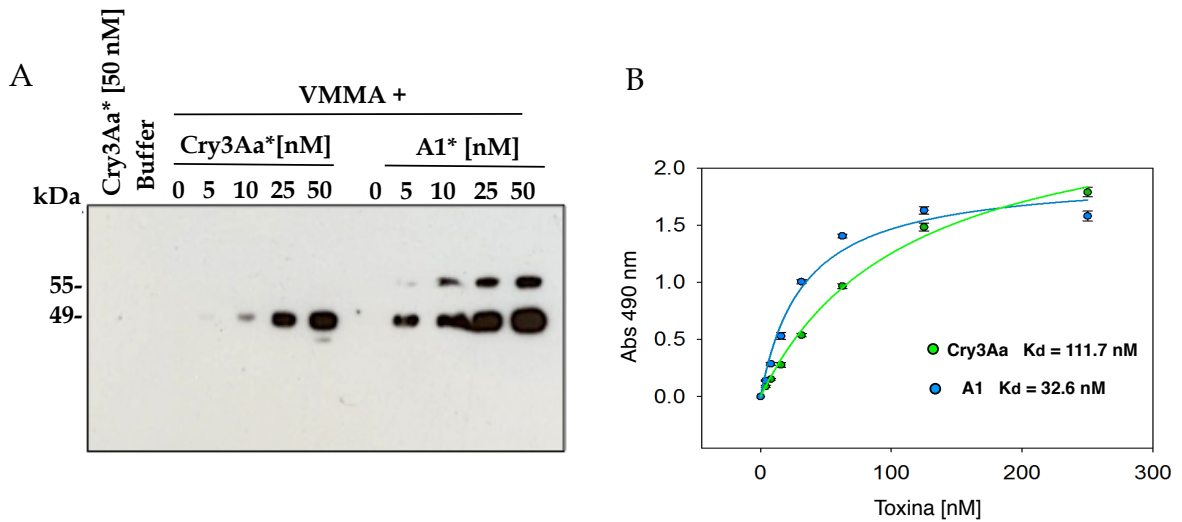


Figura 17. La toxina A1 se une más eficientemente a VMMA de *T. molitor* que la toxina Cry3Aa. **A.** Ensayo de unión en solución tipo Bosch de las toxinas Cry3Aa y A1 a VMMA de *T. molitor*. Cantidades de 10 µg de VMMA de *T. molitor* se incubaron con cantidades crecientes de toxinas Cry3Aa ó A1 marcadas con biotina (Cry3Aa*, A1*). Los primeros dos carriles corresponden a controles de precipitación consistentes en la toxina Cry3Aa* sin vesículas y el amortiguador de unión sin vesículas ni toxina. **B.** La interacción de toxinas Cry3Aa y A1 con VMMA de *T. molitor* se caracterizó mediante ELISA. Se adhirió 1 µg de VMMA y se incubaron con cantidades crecientes de las toxinas Cry3Aa* y A1*. A partir del análisis de Scatchard de las curvas de unión obtenidas en experimentos de ELISA se calcularon los valores de Kd aparente para la interacción entre la toxina Cry3Aa (111.7 nM) y la toxina A1 (32.6 nM) con VMMA de *T. molitor*.

El siguiente paso fue analizar la interacción tanto de la toxina Cry3Aa como de la toxina A1 con una sola molécula de unión.

A pesar de que se han identificado una caderina, una APN, una α -amilasa y una ALP como moléculas de unión en *T. molitor* (Fabrick J. *et al.*, 2009; Cristofolletti P. T. y Terra, W., 1999; Bulushova N. V. *et al.*, 2011, Zuniga-Navarrete F. *et al.*, 2013), la caderina es la única proteína que se ha demostrado mediante experimentos *in vivo*, que es necesaria para que la toxina Cry3Aa ejerza su actividad contra *T. molitor*. De esta proteína también se conoce su secuencia y se demostró que interacciona con la toxina Cry3Aa mediante el repetido 12 de su región extracelular (Fabrick J. *et al.*, 2009). Por ello, se decidió analizar la interacción entre el repetido 12 de la caderina de *T. molitor* y las toxinas Cry3Aa y A1. Se ordenó la síntesis de la secuencia de ADN que codifica para el repetido 12 de la caderina de *T. molitor*. El gen se clonó en el vector pET22b y se expresó de forma heteróloga en *E. coli* generando una proteína de aproximadamente 24 kDa (Figura 18).

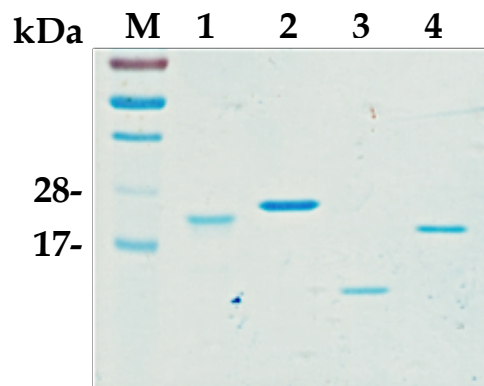
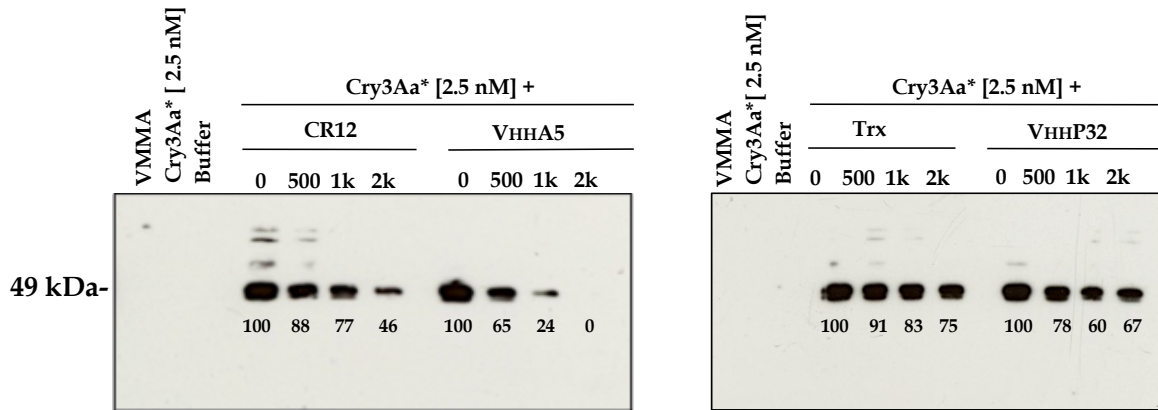


Figura 18. Proteínas utilizadas para los ensayos de competencia. El repetido 12 de la caderina de *T. molitor* (carril 1) de aproximadamente 24 kDa, el anticuerpo V_{HH}A5 (carril 2) de aproximadamente 27 kDa, la tiorredoxina (carril 3) de aproximadamente 12 kDa y el anticuerpo V_{HH}P32 (carril 4) de aproximadamente 23 kDa se expresaron heterológamente en *E. coli*. Las cuatro proteínas se purificaron mediante IMAC y se utilizaron para competir la interacción entre la toxina Cry3Aa y la toxina A1 con VMMA de *T. molitor*. La imagen muestra la tinción con colorante de Coomassie de aproximadamente 1 μ g de cada proteína.

A) Toxina Cry3Aa



B) Toxina A1 (R345A, Y350F, Y351F)

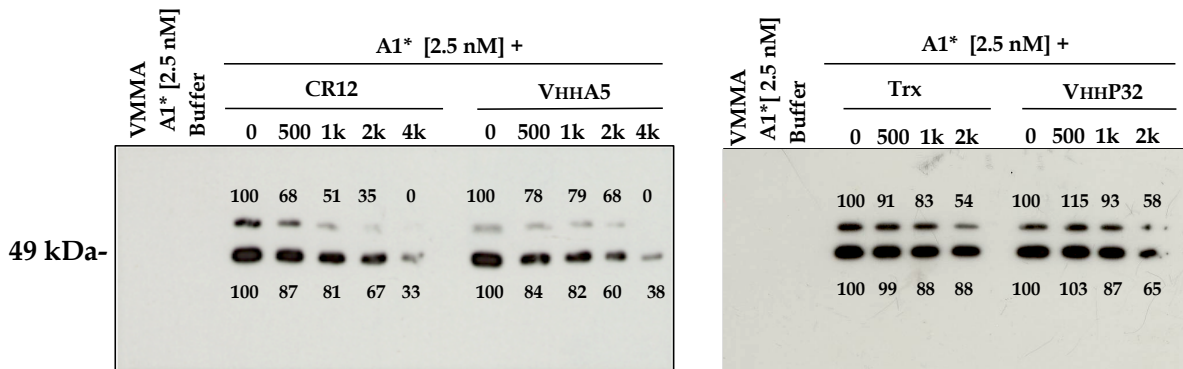


Figura 19. El fragmento CR12 y el anticuerpo V_{HH}A5 compiten la interacción de las toxinas Cry3Aa y A1 con VMMA de *T. molitor*. Ensayos de competencia en solución entre las toxinas Cry3Aa (A) y A1 (B) marcadas con biotina y VMMA de *T. molitor* utilizando excesos molares de CR12, V_{HH}A5, Tiorredoxina y V_{HH}P32. Se utilizaron 10 µg de VMMA y 2.5 nM de las toxinas marcadas con biotina. Los excesos se midieron con respecto a la cantidad de toxina marcada. Los primeros tres carriles de cada panel corresponden a los controles de precipitación consistentes en las vesículas sin toxina, la toxina en ausencia de vesículas y el amortiguador de unión sin vesículas ni toxina. Los valores en las bandas corresponden a los valores de densitometría de cada resultado analizado con el programa GelAnalyzer210a (GelAnalyzer.com).

Por otra parte, en el presente trabajo se aisló un anticuerpo de llama denominado V_{HH}A5 que se une al asa 1 de la toxina Cry3Aa.

Las dos proteínas antes descritas, el anticuerpo V_{HH}A5 y el fragmento de caderina CR12 se utilizaron en ensayos de competencia. Con dichos ensayos se esperaba determinar si la interacción del anticuerpo V_{HH}A5 ó el fragmento CR12 son capaces de bloquear la interacción de la toxina Cry3Aa con los receptores de las VMMA de *T. molitor*.

Además del anticuerpo V_{HH}A5 y el fragmento CR12, se incluyeron a manera de controles, el anticuerpo V_{HH}P32 y la tiorredoxina. Estos controles se utilizaron asumiendo que al no unirse a la toxina Cry3Aa no competirían su interacción con las VMMA de *T. molitor*.

Como se muestra en la figura 19, tanto el fragmento CR12 como el anticuerpo V_{HH}A5 compitieron la interacción de la toxina Cry3Aa y de la toxina A1 con las VMMA de *T. molitor* pero en diferentes grados. Tanto para la toxina Cry3Aa como para la toxina A1, anticuerpo V_{HH}A5 compitió más eficientemente la interacción con las vesículas. En el caso de la toxina Cry3Aa, la competencia se observó desde los 500 excesos molares (medidos con respecto a la toxina) y la interacción se abatió al utilizar 2,000 excesos. Por otra parte, se necesitó una mayor cantidad del anticuerpo para competir la interacción de la toxina A1 con las vesículas. La competencia se observó más claramente al utilizar 2,000 excesos molares y solo se logró un 60% de disminución utilizando 4,000 excesos molares.

El fragmento CR12 también compitió la interacción de la toxina Cry3Aa y de la toxina A1 con las vesículas, pero menos eficazmente que el anticuerpo V_{HH}A5. En el caso de la toxina Cry3Aa solo se logró un máximo de 54% de disminución con 2,000 excesos molares de competidor. La toxina A1 también fue más difícil de competir. Se necesitaron 4,000 excesos molares del fragmento CR12 para disminuir un 67% la interacción de la toxina A1 con las VMMA de *T. molitor*.

El anticuerpo V_{HH}P32 mostró muy poca capacidad para competir la interacción de la toxina Cry3Aa y la toxina A1 con las VMMA de *T. molitor*. La utilización de 2,000 excesos molares del anticuerpo V_{HH}P32 solamente disminuyó en un 33% la interacción de la toxina Cry3Aa y la toxina A1 con las VMMA de *T. molitor*.

La tiorredoxina tampoco fue un buen competidor. La utilización de 2,000 excesos molares de tiorredoxina solamente disminuyó en un 25% la interacción de la toxina Cry3Aa y la toxina A1 con las VMMA de *T. molitor* (Figura 19).

La capacidad del anticuerpo V_{HH}A5 y el fragmento 12 de caderina para competir la interacción entre las toxinas Cry3Aa y A1 con las VMMA también se midió mediante ensayos de ELISA.

Los ensayos de ELISA salvo por algunas diferencias, mostraron un comportamiento similar por parte de los competidores al observado en los ensayos tipo Bosh (Figura 20). Una diferencia, probablemente debida a la mayor sensibilidad de los ensayos de ELISA, fue que se necesitó de una menor cantidad de competidores para observar el efecto. A diferencia del ensayo de unión en solución, la competencia comenzó a observarse desde los 125 excesos molares, tanto para el fragmento CR12 como para el anticuerpo V_{HH}A5.

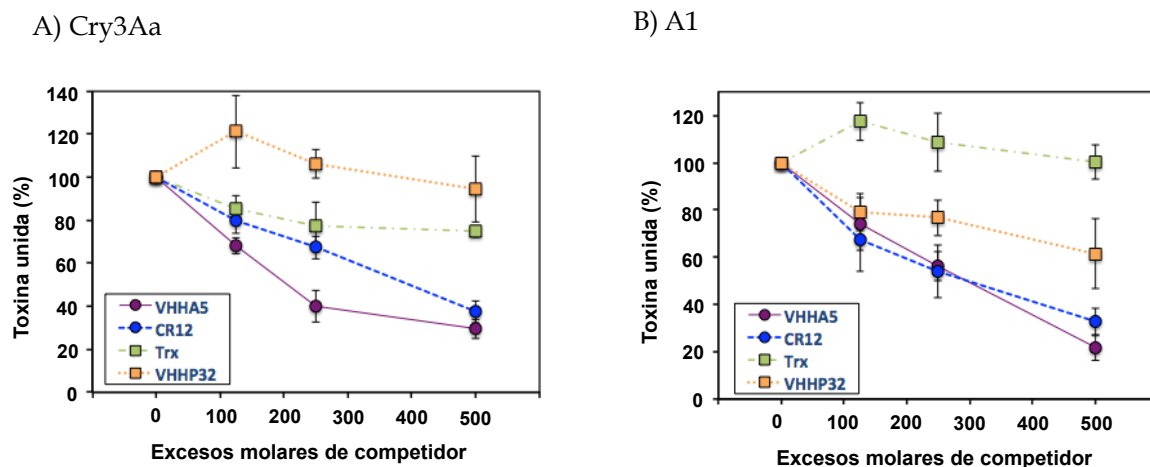


Figura 20. Competencia de la interacción de la toxina Cry3Aa y A1 con VMMA de *T. molitor*. Para los ensayos de ELISA, las toxinas Cry3Aa (A) y A1 (B) marcadas con biotina se preincubaron con los competidores (V_{HH}A5, CR12, V_{HH}P32 ó tiorredoxina). Posteriormente el complejo toxina-competidor se incubó con las vesículas adheridas a las placas de ELISA. La lectura de absorbancia correspondió a la toxina que se unió a las VMMA. La absorbancia fue normalizada con respecto un 100% de unión correspondiente a la toxina sin competidor. Los datos graficados son el promedio de dos ensayos con tres repeticiones por cada condición.

La utilización de 500 excesos molares del anticuerpo V_{HH}A5 disminuyó en un 70% la interacción entre la toxina Cry3Aa y las VMMA de *T. molitor*. Por otra parte, 500 excesos molares del fragmento de caderina CR12, disminuyeron en un 60% la interacción de la toxina Cry3Aa con las VMMA de *T. molitor*.

La capacidad de los competidores para bloquear la interacción de la toxina A1 con las VMMA de *T. molitor* fue similar a la observada con la toxina Cry3Aa. La utilización de 500 excesos molares tanto del anticuerpo V_{HH}A5 como del fragmento CR12 disminuyeron aproximadamente el 70% de la interacción entre la toxina A1 y las VMMA de *T. molitor*.

A diferencia de lo observado en los ensayos tipo Bosch, el anticuerpo V_{HH}A5 fue más eficaz para competir la interacción entre la toxina Cry3Aa y las VMMA de *T. molitor* pero no la interacción entre la toxina A1 y las VMMA de *T. molitor*. El fragmento CR12 mostró el mismo comportamiento observado en los ensayos tipo Bosch.

El anticuerpo V_{HH}P32 no compitió la interacción de la toxina Cry3Aa con las VMMA de *T. molitor*. El uso de 500 excesos molares del anticuerpo V_{HH}P32 solo disminuyó aproximadamente el 10% de dicha interacción.

El uso de 500 excesos molares del anticuerpo V_{HH}P32 disminuyó hasta un 40% la interacción de la toxina A1 con las vesículas. Sin embargo, este nivel de competencia fue bajo comparado con el obtenido al utilizar el anticuerpo V_{HH}A5 o el fragmento CR12.

La tiorredoxina, de manera similar a lo observado en los ensayos en solución no mostró capacidad para actuar como competidor.

En los ensayos anteriores se demostró que el fragmento de caderina CR12 y el anticuerpo V_{HH}A5 son capaces de bloquear la interacción de la toxina Cry3Aa y de la toxina A1 con las VMMA de *T. molitor*, pero con diferente eficacia.

Para analizar si la capacidad de bloquear la interacción entre las toxinas (Cry3Aa y A1) y las VMMA de *T. molitor* se relaciona con la afinidad de los competidores por las toxinas, se realizaron ensayos de unión en ELISA. El anticuerpo V_{HH}A5 y el fragmento CR12 se fijaron a los pozos de ELISA y se incubaron con cantidades crecientes de la toxina Cry3Aa y la toxina A1 marcadas con biotina. A partir de los datos obtenidos de estos experimentos se calcularon los valores de las K_d aparentes de las interacciones entre la toxina Cry3Aa y la toxina A1 con el fragmento CR12 y el anticuerpo V_{HH}A5 (Figura 21). Los cálculos se realizaron mediante un análisis de Scatchard con el software SigmaPlot y los resultados se resumen en la tabla 2.

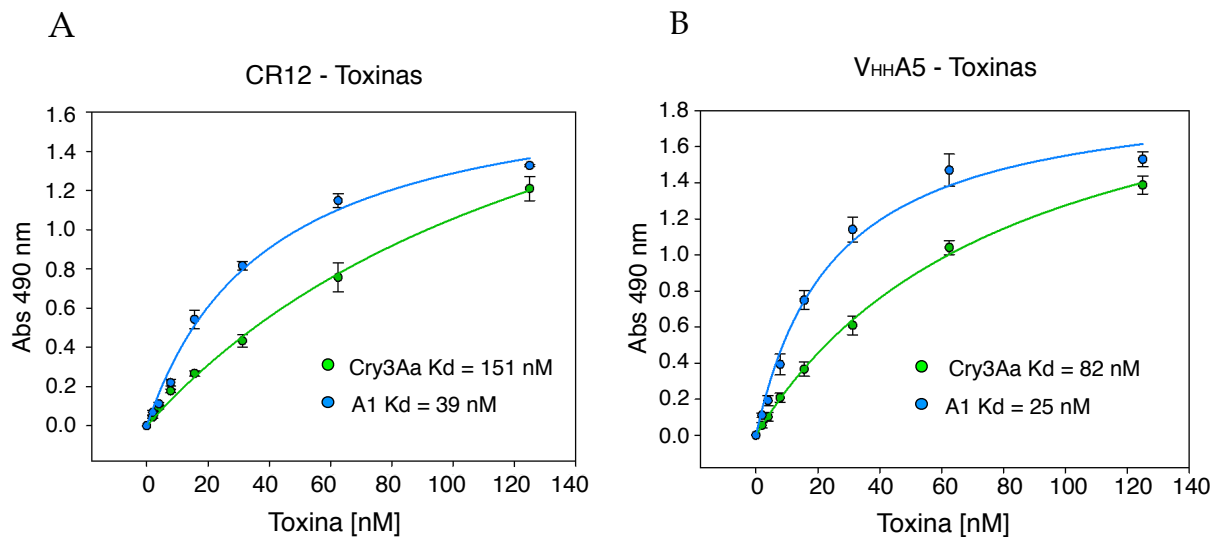


Figura 21. Las toxinas Cry3Aa y A1 se unen de manera diferente al anticuerpo V_{HH}A5 y al fragmento CR12. Ensayos de unión en ELISA. El fragmento CR12 y el anticuerpo V_{HH}A5 se adherieron a los pozos de ELISA. El fragmento CR12 y el anticuerpo V_{HH}A5 se incubaron con cantidades crecientes de la toxina Cry3Aa ó la toxina A1 marcadas con biotina. La toxina unida se detectó con streptavidina-peroxidasa. Los valores de K_d se calcularon con el programa SigmaPlot a partir de las curvas de unión. Las barras de error representan la desviación estándar de tres repeticiones.

Tabla 2. Resumen de valores de Kd aparente para las interacciones entre las toxinas Cry3Aa, CR12 y V_{HHA5} obtenidos mediante ensayos de ELISA

Toxina	Ligando	Kd [nM]
Cry3Aa	CR12	151
	V _{HHA5}	82
A1	CR12	39
	V _{HHA5}	25

Las curvas de interacción entre la toxina Cry3Aa y el fragmento CR12 y entre la toxina A1 y el fragmento CR12 muestran que cada toxina se une de manera distinta a este péptido. Los valores de Kd calculados a partir de estas curvas indican que la toxina A1 es aproximadamente tres veces más afín por el fragmento de caderina CR12 que la toxina Cry3Aa (Figura 21A).

La interacción del anticuerpo V_{HHA5} con toxina Cry3Aa y la interacción entre el anticuerpo V_{HHA5} con la toxina A1 también fue diferente. Los valores de Kd calculados indicaron que la toxina A1 es aproximadamente tres veces más afín por el anticuerpo V_{HHA5} que la toxina Cry3Aa (Figura 21B). Los valores de Kd muestran que el anticuerpo V_{HHA5} es aproximadamente dos veces más afín tanto por la toxina Cry3Aa como por la toxina A1 que el fragmento CR12. Esto puede atribuirse a diferencias en el sitio de la toxina con el que se da la interacción.

El anticuerpo V_{HH}A5 fue seleccionado contra el asa 1 del dominio II de la toxina Cry3Aa. Sin embargo el sitio en la toxina Cry3Aa que interacciona con el fragmento CR12 no había sido definido. Para definirlo, se realizaron ensayos de competencia en ELISA (Figura 22). La toxina Cry3Aa marcada con biotina (Cry3Aa*) se pre-incubó con el anticuerpo V_{HH}A5. Posteriormente, el complejo formado por el anticuerpo unido a la toxina Cry3Aa* se incubó con el fragmento CR12 inmovilizado en los pozos de ELISA. De manera similar, la toxina Cry3Aa* se preincubó con el fragmento CR12 y el complejo se incubó con el anticuerpo V_{HH}A5 inmovilizado.

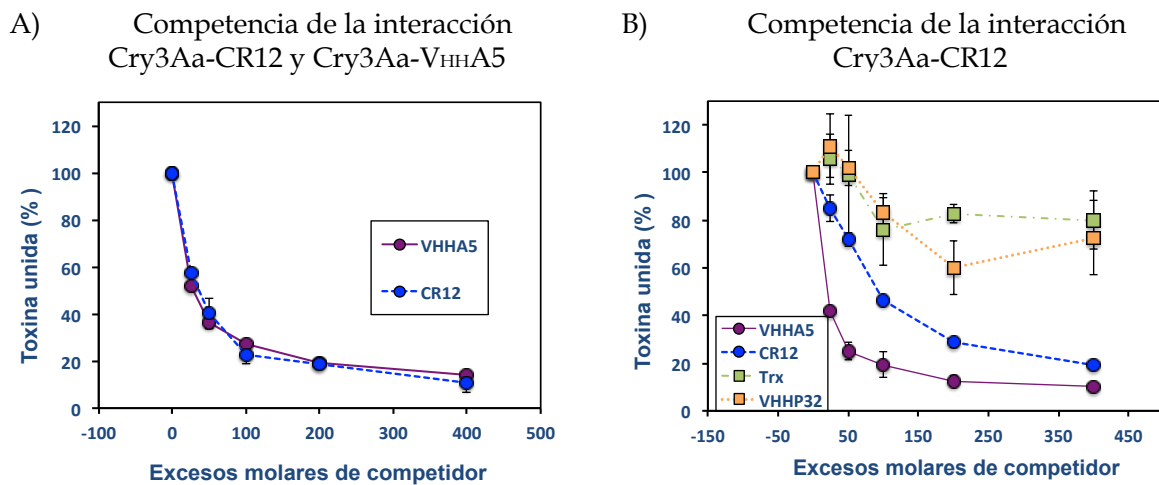


Figura 22. El anticuerpo V_{HH}A5 y el fragmento de caderina CR12 comparten el sitio de unión a la toxina Cry3Aa. **A.** Se inmovilizó el anticuerpo V_{HH}A5 ó el CR12 a la placa de ELISA. La toxina Cry3Aa marcada con biotina (Cry3Aa*) se incubó el competidor (V_{HH}A5 ó CR12) y el complejo Cry3Aa*-competidor se incubó con la proteína inmovilizada en la placa de ELISA (V_{HH}A5 ó CR12). La absorbancia correspondió a la toxina unida al receptor inmovilizado. **B.** Se inmovilizó el fragmento CR12 en la placa de ELISA. La toxina Cry3Aa* se preincubó con los péptidos CR12, V_{HH}A5, tiorredoxina y V_{HH}P32. El complejo Cry3Aa*-competidor se incubó con el fragmento CR12 inmovilizado en la placa de ELISA. La toxina capaz de unirse al fragmento CR12 inmovilizado en la placa fue detectada con streptavidina acoplada a peroxidasa.

Como se muestra en la figura 22A, la unión del CR12 a la toxina Cry3Aa* impide que esta interaccione con el anticuerpo V_{HH}A5. A su vez, la unión del anticuerpo V_{HH}A5 al asa 1 de la toxina Cry3Aa* impide que esta interaccione con el fragmento de caderina CR12. De lo anterior se puede concluir que el fragmento CR12, al igual que el anticuerpo V_{HH}A5 se unen al asa 1 del dominio II de la toxina Cry3Aa.

Adicionalmente, se probó la eficacia del anticuerpo V_{HH}A5 para bloquear la interacción de la toxina Cry3Aa con el fragmento de caderina. Para esto el CR12 se inmovilizó en las pozos de ELISA y la toxina Cry3Aa marcada con biotina (Cry3Aa*) se preincubó con el mismo fragmento CR12 para realizar una competencia homóloga y con el anticuerpo V_{HH}A5 para realizar una competencia heteróloga. A manera de controles, la toxina Cry3Aa* también se pre-incubó con el anticuerpo V_{HH}P32 y la con la tiorredoxina.

Como se muestra en la figura 22B, se necesitaron cantidades menores del anticuerpo V_{HH}A5 que del fragmento CR12 para bloquear el asa 1 de la toxina e impedir la interacción con el fragmento CR12 inmovilizado. La utilización de 25 excesos molares del anticuerpo V_{HH}A5 se reduce en un 50% la interacción de la toxina Cry3Aa con el fragmento CR12. Sin embargo, 25 excesos molares del fragmento CR12 reducen un 30% la interacción de la toxina Cry3Aa con el fragmento CR12 inmovilizado. Esto comprueba que el anticuerpo V_{HH}A5 se une con mayor afinidad que el fragmento CR12 a la toxina Cry3Aa. También se comprobó que tanto la interacción entre el CR12 y la toxina Cry3Aa como la interacción entre el anticuerpo V_{HH}A5 y la toxina Cry3Aa son específicas.

El anticuerpo V_{HH}P32 y la tiorredoxina no compitieron la interacción de la toxina Cry3Aa con el fragmento de caderina.

DISCUSIÓN

Las toxinas Cry producidas por la bacteria *B. thuringiensis* han resultado una herramienta valiosa en el combate de las plagas de diferentes cultivos durante las últimas dos décadas. Sin embargo, aunque se han logrado avances significativos en el entendimiento de su mecanismo de acción, la disección a fondo de este sigue siendo elusiva.

Actualmente es ampliamente aceptado que el proceso de intoxicación, estudiado principalmente en lepidópteros, consiste de varios pasos que involucran la interacción con receptores como la caderina, la APN y la ALP y que culmina con la inserción de poros en las membranas celulares. Más recientemente se propuso un modelo alternativo en el que la interacción con el receptor caderina es suficiente para desencadenar la muerte de las células intestinales mediante un proceso de señalización intracelular (Zhang X. B. *et al.*, 2006). Sin embargo, la evidencia reportada hasta ahora respalda la importancia de la formación de poros líticos y que son necesarios más de un receptor para que la toxina ejerza su actividad completa. Adicionalmente, con la utilización de técnicas genómicas y proteómicas se han descubierto en los intestinos de insectos susceptibles, otras moléculas de unión además de las conocidas caderina, APN y ALP que podrían funcionar como receptores para las toxinas Cry.

En el caso de los insectos del orden de los coleópteros, a pesar de que varias especies son plagas importantes para diferentes cultivos, su estudio se ha visto limitado por características tales como sus hábitos alimenticios, que dificultan su cultivo en condiciones de laboratorio ó su baja susceptibilidad a las toxinas Cry, que dificulta la realización de bioensayos.

A pesar de esto, gracias a la aplicación de varias metodologías, en insectos coleópteros se han reportado proteínas de unión de diversas naturalezas (Ochoa-Campuzano C. *et al.*, 2007; Fabrick J. *et al.*, 2009; Park Y. *et al.*, 2009; Bulushova N. V. *et al.*, 2011).

Notablemente, a pesar de que las proteínas ancladas por GPI como la APN y la ALP están ampliamente distribuidas entre especies de dípteros y lepidópteros como receptores de toxinas Cry (Knight P. J. K. *et al.*, 1994; Fernandez L. E. *et al.*, 2006; Zhang R. *et al.*, 2008; Chen J. *et al.*, 2009), solo se ha reportado una APN del coleóptero *Anthonomus grandis* como posible receptor de la toxina Cry8Ka5 (Nakasu E. Y. *et al.*, 2010).

En el presente trabajo se comprobó que las vesículas de intestinos de *T. molitor* tratadas con PLPC, la cual corta el anclaje de PLPC que une a ciertas proteínas a la membrana, perdieron parte de su capacidad de unirse a la toxina Cry3Aa. Esto indicó la importancia de este tipo de proteínas para la interacción entre la toxina con las células intestinales de *T. molitor* (Figura 9). Adicionalmente, los ensayos de unión a ligando sugieren que hasta siete proteínas ancladas por GPI del intestino de este insecto, podrían interaccionar con la toxina Cry3Aa (Figura 10).

Aunque la pérdida parcial del anclaje por GPI y la detección de productos de degradación podría visualizarse como bandas muy cercanas entre sí, disminuyendo el número de proteínas independientes, se distinguen al menos seis bandas en las vesículas completas y cuatro en la fracción soluble después del tratamiento con PLPC (Figura 10B). De entre estas, la proteína de 120 kDa se asemeja en la talla a las APNs reportadas para otros insectos (Zhang R. *et al.*, 2008; Chen J. *et al.*, 2009), sin embargo, en un trabajo previo se reportó que existe solamente una forma de APN con una talla de 90 kDa en el intestino de *T. molitor*.

En dicho trabajo se reporta que esta APN está anclada a la membrana pero probablemente no por GPI ó bien por una forma resistente al tratamiento con PLPC, ya que no pudo obtenerse mediante tratamiento con esta enzima, sino por solubilización de la membrana con detergentes (Cristofolletti P. T. y Terra, W., 1999). Desafortunadamente no se analizó la interacción de esta proteína con la toxina Cry3Aa.

En otro trabajo se reportó a otra proteína de tamaño similar, en este caso de aproximadamente 144 kDa que fue aislada mediante inmunoprecipitación usando la toxina Cry3Aa (Belfiore C. J. *et al.*, 1994). Sin embargo, esta proteína no fue sujeta a posteriores análisis y su identidad no fue aclarada.

Las proteínas aquí detectadas como de 68 y 60 kDa aproximadamente, guardan cierta similitud con las reportadas en el trabajo de Bulushova como de 66 y 58 kDa (Bulushova N. V. *et al.*, 2011) y que fueron identificadas como una α -amilasa y una ATPasa respectivamente. Sin embargo, en diferentes insectos se han identificado proteínas del tipo de las ALPs con tallas de entre 55 y 68 kDa (McNall R. J. y Adang, M. J., 2003; Fernandez L. E. *et al.*, 2006; Ning C. *et al.*, 2010) como posibles receptores de las toxinas Cry. Dada la similitud de los tamaños de estas proteínas y el que se hayan identificado mediante secuenciación a partir de geles de una sola dimensión, es posible considerar que la abundancia de la α -amilasa y la ATPasa pueden ocultar la presencia de una fosfatasa alcalina de tamaño similar, que adicionalmente a estas dos participe en la interacción con la toxina Cry3Aa.

Los resultados aquí presentados indican que es posible que la proteína de 68 kDa sea una fosfatasa alcalina y la de 60 kDa un producto de degradación de la primera, de manera similar a lo previamente reportado por Fernández (Fernandez L. E. *et al.*, 2006).

Los ensayos de actividad en gel demuestran que existen proteínas con actividad de ALP en el intestino de *T. molitor* y que pueden obtenerse en la fracción soluble después del tratamiento con PLPC (Figura 11A). También se demuestra que estas proteínas son capaces de unirse a la toxina Cry3Aa (Figura 12A) y que cuando la banda con actividad de ALP se resuelve en un gel desnaturizante, migra como dos bandas de 68 y 60 kDa (Figura 12B). A pesar de estas evidencias, se necesitaría un análisis más directo como la secuenciación para aclarar la identidad de estas proteínas.

De entre las proteínas de 40 kDa, 30 kDa e inferiores, sólo la de 40 kDa se detecta de manera similar entre las proteínas ancladas por GPI y en las vesículas completas. El resto se observan más claramente en las vesículas completas y sólo se detectan tenuemente entre las proteínas ancladas por GPI (Figura 10), lo cual puede indicar que se detectan más por su abundancia que por estar ancladas por GPI.

El antecedente más cercano respecto a proteínas de estas tallas en coleópteros es la metaloproteasa ADAM10 de 25 kDa y que no está anclada por GPI (Ochoa-Campuzano C. *et al.*, 2007). Sin embargo, para ningún otro orden de insectos se ha reportado una metaloproteasa como receptor de toxinas Cry y en *T. molitor* tampoco hay antecedentes de proteínas de unión de estas tallas. Por lo tanto la cuestión sobre sus identidades y si son verdaderamente proteínas de unión a la toxina Cry3Aa permanece por aclararse.

A pesar de que en un reporte previo se señala que la fosfatasa alcalina no está presente en el intestino de *T. molitor* (Bulushova N. V. *et al.*, 2011), también se ha reportado que a pesar de que la cantidad es mucho menor comparada con la fosfatasa ácida, la fosfatasa alcalina está presente, es distinguible de la forma ácida (Ferreira C. *et al.*, 1990) y su expresión se ha relacionado con la exposición de las larvas de *T. molitor* a la toxina Cry3Aa (Oppert B. *et al.*, 2012).

La aparente contradicción en los resultados obtenidos en este trabajo y estudios previos podría radicar en dos diferencias. Por una parte el estadio de las larvas utilizadas para los análisis ya que en los estudios antes mencionados se utilizaron larvas de los últimos estadios de desarrollo (120-150 mg/larva), mientras que en el presente estudio y en el trabajo de Oppert se utilizaron larvas de los primeros estadios de desarrollo (5-10 mg/larva).

Este argumento se sustenta en lo reportado para dos especies de lepidópteros, *M. sexta* y *Helicoverpa armigera*, en los que la fosfatasa alcalina se expresa preferentemente en los estadios tempranos del desarrollo larvario y que esto se relaciona con la mayor susceptibilidad de las larvas de estos insectos hacia las toxinas Cry1As (Arenas I. *et al.*, 2010; Upadhyay S. K. y Singh, P. K., 2011). De manera similar, en el presente trabajo, la comparación entre los patrones de unión de la toxina Cry3Aa a vesículas purificadas de larvas de dos diferentes estadios de desarrollo, indicó que hay diferencias en las proteínas a las que se une la toxina Cry3Aa y que la proteína de 68 kDa se detecta más fácilmente en larvas de estadios tempranos (Figura 13).

La otra causa de la inconsistencia de los resultados reportados podría ser la región de los intestinos utilizados en los diferentes estudios. Para analizar las actividades enzimáticas se utilizó solamente la región media del intestino (Ferreira C. *et al.*, 1990) y para realizar los ensayos de unión a ligando se utilizó el extremo posterior (Bulushova N. V. *et al.*, 2011). El hecho de que las proteínas no estén distribuidas de manera homogénea a lo largo de los intestinos de las larvas, aunado a la reducida cantidad de fosfatasa alcalina fue probablemente la causa de las diferencias en los datos reportados.

A pesar de la evidencia aquí mostrada, la identidad de la fosfatasa alcalina reportada en este trabajo aún necesita confirmarse por secuenciación y su función como receptor de la toxina Cry3Aa necesita analizarse mediante métodos como el RNA de interferencia por ejemplo, que se utilizó previamente para la caderina (Fabrick J. *et al.*, 2009).

Otra de las cuestiones fundamentales referente al estudio de las toxinas Cry, además de la identidad de los receptores que utilizan, es en qué radica la especificidad de las toxinas y la potencia tóxica. Se ha especulado y analizado mucho al respecto y las diferencias en toxicidades se han atribuido a causas como el proceso de activación por proteasas (Almond B. D. y Dean, D. H., 1993) y a la interacción con las proteínas de unión (Gomez I. *et al.*, 2007) sin llegar a un consenso hasta ahora. Los avances realizados en los últimos años en la comprensión del mecanismo de acción de las toxinas Cry, han ampliado la gama de causas por las que las toxinas pueden poseer diferente especificidad y niveles de actividad y han mostrado que el mecanismo de acción puede ser más complejo de lo inicialmente planteado (Pacheco S. *et al.*, 2009).

Como se mencionó antes, el descubrimiento de nuevas moléculas con las que las toxinas Cry pueden interaccionar en los intestinos de los insectos podría explicar, al menos en parte las diferencias entre toxicidades. Sin embargo para la mayoría de ellas la caracterización es aún incipiente. A pesar de esto, el enfoque de la interacción de las toxinas con sus proteínas de unión puede ser empleado para un diseño racional de metodologías para la producción de toxinas Cry con características deseadas.

Tales características pueden ser un mayor o menor espectro de acción; menor cuando se desea combatir a una plaga específica ó mayor para atacar a una batería de organismos. Una mayor potencia tóxica podría ser útil en el caso de toxinas con baja actividad y el cambio de espectro de acción podría ser una solución para dirigir toxinas Cry hacia plagas que no son afectadas por alguna de las toxinas actualmente disponibles.

En el presente trabajo se abordó la interacción de la toxina con sus proteínas de unión como una variable fundamental de la potencia tóxica. Debido a la carencia inicial de formas clonadas o purificadas de proteínas de unión para la toxina Cry3Aa e incluso de las secuencias de estas, se decidió buscar una molécula que sirviera como sustituto de los receptores de la toxina. Con base en el éxito obtenido al aislar un scFv que puede mimetizar al receptor Bt-R1 de *M. sexta* (Gomez I. *et al.*, 2001), en este trabajo se utilizaron las metodologías del despliegue en fagos para buscar un anticuerpo de llama (*Lama glama*) que pudiera mimetizar a algún receptor para la toxina Cry3Aa.

Durante las rondas de selección, la persistencia de clonas con copias trucas de los genes de anticuerpos hizo necesaria la estrategia de reclonación entre rondas e impidió el análisis confiable de la variabilidad obtenida entre cada ronda. Esto a su vez impidió el tomar medidas para conservar la variabilidad de las clonas seleccionadas.

Todo lo anterior repercutió en la baja variabilidad obtenida al final de la tercera ronda y posiblemente también debido a esto, la secuencia del anticuerpo V_{HH}A5 se alejó de las secuencias canónicas de anticuerpos de llama.

El anticuerpo V_{HH}A5 carece de las sustituciones de aminoácidos Val37Phe, Gly44Glu, Leu45Arg y Trp47Gly que se ha comprobado son importantes para características como la solubilidad y estabilidad de estos anticuerpos (Muyldermans S. *et al.*, 1994; Conrath K. *et al.*, 2005). Esto es posiblemente la causa de que el anticuerpo V_{HH}A5 se produzca con bajos rendimientos. Si bien es posible producirlo de forma soluble, el rendimiento después de su purificación dificultó su utilización en esta forma, por lo que fue necesaria la fusión del anticuerpo con la tiorredoxina, que incrementó el rendimiento con solo un mínimo efecto sobre la interacción con la toxina Cry3Aa .

La característica que el anticuerpo V_{HH}A5 sí conservó en común con los anticuerpos de llama fue el CDR3 extendido (Hamers-Casterman C. *et al.*, 1993; Harmsen M. M. y De Haard, H. J., 2007) (Figura 16) que resultó importante para la interacción con la toxina Cry3Aa. Sin embargo aunque se determinó que el CDR3 es el más importante para la interacción con la toxina Cry3Aa, los otros CDRs también participan en dicha interacción. Esto se demostró en el ensayo de ELISA en el que los CDRs 1 y 2 bloquean cada uno hasta el 50% de la interacción entre el anticuerpo V_{HH}A5 y la toxina Cry3Aa (Figura 17B).

Es posible que la interacción total no sea determinada por una región sino que se deba a un fenómeno dependiente de la estructura, en la que los tres determinantes sean importantes. Está bien documentado que esto sucede con otros anticuerpos de camélidos y de los que se cuenta con estructuras cristalográficas (De Genst E. *et al.*, 2006). A pesar de sus desventajas fue posible utilizar al anticuerpo V_{HH}A5 para tener una alternativa de proteína de unión a la toxina Cry3Aa.

Posteriormente se obtuvo el fragmento de caderina CR12 (Fabrick J. *et al.*, 2009) que sirvió para complementar el estudio de la relación entre afinidad por los receptores y toxicidad. El CR12 tiene ventajas como provenir de un coleóptero, ser un ligando bien documentado de la toxina Cry3Aa y ser parte de una proteína de tipo caderina. Esto último es una ventaja ya que existen muchos antecedentes de la interacción de las toxinas Cry con estos receptores en otros ordenes de insectos.

Estas dos herramientas se complementaron con la obtención de la mutante A1 de la toxina Cry3Aa. La toxicidad incrementada de esta mutante fue fundamental para la comparación de las afinidades por las dos moléculas de unión. Una vez calculadas, fue evidente que existe una relación entre la afinidad de la toxina Cry3Aa por sus receptores y la toxicidad hacia *T. molitor* (Tabla 2).

El que se haya encontrado una relación directa entre la toxicidad y la afinidad por los receptores puede ser atribuida en primer lugar a que la diferencia en la actividad entre la toxina Cry3Aa y la mutante A1 es grande (A1 es 11 veces más tóxica contra *T. molitor*). Esto considerando que la diferencia en la toxicidad es debida solo a tres mutaciones y si se compara con resultados obtenidos con metodologías similares (Dean D. H. *et al.*, 1996). La otra causa es que la región con la que el fragmento CR12 y el V_{HH}A5 interaccionan es el asa 1 del dominio II que es precisamente la región en la que ubican las mutaciones.

El anticuerpo V_{HH}A5 resultó más afin por ambas versiones de la toxina que el CR12 (Figura 22B), lo cual podría explicarse por la participación de los tres CDRs del anticuerpo en la interacción con la toxina. Esto podría de cierta forma emular lo que sucede con regiones mayores del receptor caderina, ya que se sabe que en *M. sexta*, la afinidad del fragmento que comprende los repetidos 7-12 de caderina es 5 veces mayor que la del repetido 12 por si solo (Pacheco S. *et al.*, 2009).

Sin embargo, aún la afinidad de la toxina mutante por el V_{HH}A5 fue aproximadamente la mitad del valor de la afinidad de la toxina Cry1Ab por el repetido 12 de la caderina de *M. sexta* (Pacheco S. *et al.*, 2009). Esto deja ver la posibilidad de un mayor incremento de la actividad de la toxina Cry3Aa si se incrementa aún más su afinidad por la caderina.

Esta posibilidad es especialmente interesante ya que en el trabajo de Fujii, un gran aumento de la afinidad de la toxina Cry1Aa por una caderina (~40 veces) solo resultó en un muy discreto incremento de la actividad (~2 veces) (Fujii Y. *et al.*, 2013). Sin embargo, en la toxina Cry3Aa un incremento discreto de la afinidad (~3 veces) resultó en un mayor incremento de la actividad (~11 veces). Esto hace suponer que existe un límite para la afinidad con la que la toxina puede interaccionar con sus receptores y seguir siendo tóxica. Posiblemente pueda incrementarse la afinidad por los receptores mientras la interacción siga siendo reversible (Liang Y. *et al.*, 1995) y no se impida que la toxina se una a otros receptores como plantea el modelo de ping-pong (Pacheco S. *et al.*, 2009).

Existen variedad de cuestiones por aclarar acerca de los receptores de la toxina Cry3Aa y su capacidad tóxica. Sin embargo, en el presente trabajo se demostró que estrategias como aislar proteínas que mimeticen a un receptor ó incrementar la toxicidad de una proteína Cry al incrementar su afinidad por uno de sus receptores, podrían ser útiles para futuros intentos de aumentar la efectividad de proteínas como la toxina Cry3Aa. Con esta toxina además, podrían explorarse otras regiones no consideradas en este trabajo. Es muy probable que regiones de la toxina, por ejemplo las otras dos asas del dominio II, interaccionen con diferentes receptores y es posible que de manera similar a lo reportado para las toxinas Cry1A, todo el dominio III sea importante para la interacción con receptores, especialmente regiones discretas como las $\beta 16$ o la $\beta 22$ (Gomez I. *et al.*, 2006).

Lo anterior permite suponer además, que las dichas regiones en la toxina Cry3Aa podrían interaccionar con receptores equivalentes a los hallados en lepidópteros como la fosfatasa alcalina descrita en este trabajo u otros aún por describir. Esto último, la descripción de nuevas moléculas de unión en coleópteros, similares a las descritas en otros órdenes como los dípteros y lepidópteros, ayudaría a sustentar la teoría de la conservación del mecanismo de acción de las toxinas Cry y quizá con ello a un mejor entendimiento de este.

CONCLUSIONES

Se determinó que las proteínas ancladas por GPI son importantes para la interacción de la toxina Cry3Aa con VMMA de *T. molitor*.

Se identificó una proteína de aproximadamente 68 kDa con actividad de fosfatasa alcalina en el intestino de *T. molitor* que se une a la toxina Cry3Aa en ensayos de ligand blot.

A partir de una biblioteca de anticuerpos de llama desplegados en fagos se aisló al anticuerpo V_{HH}A5 que interacciona con el asa 1 del dominio II de la toxina Cry3Aa y compete la interacción de esta toxina con VMMA de *T. molitor*.

Se determinó que la actividad incrementada de la toxina A1 (Cry3Aa R345A, Y350F, Y351F) se debe al menos en parte al incremento de la afinidad por el receptor caderina.

PERSPECTIVAS

Secuenciar a la proteína de 68 kDa con actividad de fosfatasa alcalina.

Analizar la importancia de regiones del dominio III de la toxina Cry3Aa.

Construir variantes de la toxina Cry3Aa con mayor afinidad al repetido 12 de la caderina de *T. molitor* ó al anticuerpo V_{HH}A5 y analizar su toxicidad.

BIBLIOGRAFIA

- Abdullah, M. A., Valaitis, A. P. y Dean, D. H. (2006)** Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry* 7 16
- Agrawal, N., Malhotra, P. y Bhatnagar, R. K. (2002)** Interaction of gene-cloned and insect cell-expressed aminopeptidase N of *Spodoptera litura* with insecticidal crystal protein Cry1C. *Applied and Environmental Microbiology* 68 9: 4583-4592
- Almond, B. D. y Dean, D. H. (1993)** Structural stability of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin homolog-scanning mutants determined by susceptibility to proteases. *Applied and Environmental Microbiology* 59 8: 2442-2448
- Amaro Estrada, I. (2007)** Construcción y caracterización de una biblioteca de fragmentos variables de anticuerpos de cadena pesada de *Lama glama* desplegados en fagos. Tesis de Maestría, 52 páginas. Dirigida por: Dr. E. Ortíz Suri. Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México.
- Angst, B. D., Marcozzi, C. y Magee, A. I. (2001)** The cadherin superfamily: diversity in form and function. *Journal of Cell Science* 114 4: 629-641
- Arantes, O. y Lereclus, D. (1991)** Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* 108 1: 115-119
- Arenas, I., Bravo, A., Soberon, M. y Gomez, I. (2010)** Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *The Journal of Biological Chemistry* 285 17: 12497-12503
- Aronson, A. I., Wu, D. y Zhang, C. L. (1995)** Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. *Journal of Bacteriology* 177 14: 4059-4065
- Banks, D. J., Jurat-Fuentes, J. L., Dean, D. H. y Adang, M. J. (2001)** *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry1Fa delta-endotoxin binding to a novel 110 kDa aminopeptidase in *Heliothis virescens* is not N-acetylgalactosamine mediated. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31 9: 909-918
- Bayyareddy, K., Andacht, T. M., Abdullah, M. A. y Adang, M. J. (2009)** Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39 4: 279-286
- Belfiore, C. J., Vadlamudi, R. K., Osman, Y. A. y Bulla, L. A., Jr. (1994)** A specific binding protein from *Tenebrio molitor* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 200 1: 359-364
- Benhar, I. (2001)** Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnology Advances* 19 1: 1-33
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D. J. y Li, J. (2005)** Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *Journal of Molecular Biology* 348 2: 363-382
- Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C. y Lescar, J. (2006)** Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *Journal of Bacteriology* 188 9: 3391-3401
- Bravo, A. (1997)** Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains. *Journal of Bacteriology* 179 9: 2793-2801

- Bravo, A., Gill, S. S. y Soberon, M. (2007)** Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49 4: 423-435
- Bravo, A., Gomez, I., Conde, J., Munoz-Garay, C., Sanchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S. S. y Soberon, M. (2004)** Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta* 1667 1: 38-46
- Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S. S. y Soberon, M. (2011)** *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41 7: 423-431
- Brown, K. L. y Whiteley, H. R. (1988)** Isolation of a *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase capable of transcribing crystal protein genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 85 12: 4166-4170
- Brown, K. L. y Whiteley, H. R. (1990)** Isolation of the second *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase that transcribes from a crystal protein gene promoter. *Journal of Bacteriology* 172 12: 6682-6688
- Bulushova, N. V., Zhuzhikov, D. P., Lyutikova, L. I., Kirillova, N. E., Zalunin, I. A. y Chestukhina, G. G. (2011)** Toxin-binding proteins isolated from yellow mealworm *Tenebrio molitor* and wax moth *Galleria mellonella*. *Biochemistry (Mosc)* 76 2: 202-208
- Carlson, C. R. y Kolsto, A. B. (1993)** A complete physical map of a *Bacillus thuringiensis* chromosome. *Journal of Bacteriology* 175 4: 1053-1060
- Carroll, J., Convents, D., Van Damme, J., Boets, A., Van Rie, J. y Ellar, D. J. (1997)** Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A delta-endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. *Journal of Invertebrate Pathology* 70 1: 41-49
- Carroll, J., Li, J. y Ellar, D. J. (1989)** Proteolytic processing of a coleopteran-specific delta-endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Biochemical Journal* 261 1: 99-105
- Chen, J., Aimanova, K. G., Pan, S. y Gill, S. S. (2009)** Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39 10: 688-696
- Conrath, K., Vincke, C., Stijlemans, B., Schymkowitz, J., Decanniere, K., Wyns, L., Muyldermans, S. y Loris, R. (2005)** Antigen binding and solubility effects upon the veneering of a camel VHH in framework-2 to mimic a VH. *Journal of Molecular Biology* 350 1: 112-125
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. y Dean, D. H. (1998)** Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 807-813
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A. y Dean, D. H. (2000)** *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html.
- Cristofolletti, P. T. y Terra, W. (1999)** Specificity, anchoring and subsites in the active center of a microvillar aminopeptidase purified from *Tenebrio molitor* (Coleoptera) midgut cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29 807-819
- De Genst, E., Silence, K., Decanniere, K., Conrath, K., Loris, R., Kinne, J., Muyldermans, S. y Wyns, L. (2006)** Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 103 12: 4586-4591

- de Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N. y Schnepf, H. E. (2003) Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics* 37 409-433
- Dean, D. H., Rajamohan, F., Lee, M. K., Wu, S. J., Chen, X. J., Alcantara, E. y Hussain, S. R. (1996) Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis--a minireview. *Gene* 179 1: 111-117
- Delucca, A. J., Palmgren, M. S. y Debarjac, H. (1984) A New Serovar of *Bacillus thuringiensis* from Grain Dust - *Bacillus thuringiensis* Serovar Colmeri (Serovar-21). *Journal of Invertebrate Pathology* 43 3: 437-438
- Delucca, A. J., Simonson, J. y Larson, A. (1979) Two New Serovars of *Bacillus thuringiensis* - Serovars Dakota and Indiana (Serovars 15 and 16). *Journal of Invertebrate Pathology* 34 3: 323-324
- Dulmage, H. T. (1970) Insecticidal Activity of HD-1, a New Isolate of *Bacillus-thuringiensis* Var. *Alesti*. *Journal of Invertebrate Pathology* 15 2: 232-239
- Eguchi, M. (1995) Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 111 2: 151-162
- Fabricks, J., Oppert, C., Lorenzen, M. D., Morris, K., Oppert, B. y Jurat-Fuentes, J. L. (2009) A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. *The Journal of Biological Chemistry* 284 27: 18401-18410
- Fernandez, L. E., Aimanova, K. G., Gill, S. S., Bravo, A. y Soberon, M. (2006) A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochemical Journal* 394 Pt 1: 77-84
- Ferreira, C., Bellinello, G., Riberio, A. y Terra, W. (1990) Digestive enzymes associated with the glycocalix, microvillar membranes and secretory vesicles from midgut cells of *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochemistry* 20 8: 839 - 847
- Flores-Escobar, B., Rodriguez-Magadan, H., Bravo, A., Soberon, M. y Gomez, I. (2013) Differential role of *Manduca sexta* aminopeptidase-N and alkaline phosphatase in the mode of action of Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 79 15: 4543-4550
- Fujii, Y., Tanaka, S., Otsuki, M., Hoshino, Y., Endo, H. y Sato, R. (2013) Affinity maturation of Cry1Aa toxin to the *Bombyx mori* cadherin-like receptor by directed evolution. *Molecular Biotechnology* 54 3: 888-899
- Gahan, L. J., Gould, F. y Heckel, D. G. (2001) Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293 5531: 857-860
- Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J. R., Pangborn, W. y English, L. (2001) Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallographica Section D* 57 Pt 8: 1101-1109
- Gao, Y., Jurat-Fuentes, J. L., Oppert, B., Fabricks, J. A., Liu, C., Gao, J. y Lei, Z. (2011) Increased toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa against *Crioceris quatuordecimpunctata*, *Phaedon brassicae* and *Colaphellus bowringi* by a *Tenebrio molitor* cadherin fragment. *Pest Management Science* 67 9: 1076-1081

- Garner, K. J., Hiremath, S., Lehtoma, K. y Valaitis, A. P. (1999) Cloning and complete sequence characterization of two gypsy moth aminopeptidase-N cDNAs, including the receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29 6: 527-535
- Geny, B. y Popoff, M. R. (2006) Bacterial protein toxins and lipids: pore formation or toxin entry into cells. *Biology of the Cell* 98 11: 667-678
- Gill, M. y Ellar, D. (2002) Transgenic *Drosophila* reveals a functional in vivo receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. *Insect Molecular Biology* 11 6: 619-625
- Glatron, M. F. y Rapoport, G. (1972) Biosynthesis of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis*: half-life of its corresponding messenger RNA. *Biochimie* 54 10: 1291-1301
- Gomez, I., Arenas, I., Benitez, I., Miranda-Rios, J., Becerril, B., Grande, R., Almagro, J. C., Bravo, A. y Soberon, M. (2006) Specific epitopes of domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. *The Journal of Biological Chemistry* 281 45: 34032-34039
- Gomez, I., Oltean, D. I., Gill, S. S., Bravo, A. y Soberon, M. (2001) Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. *The Journal of Biological Chemistry* 276 31: 28906-28912
- Gomez, I., Pardo-Lopez, L., Munoz-Garay, C., Fernandez, L. E., Perez, C., Sanchez, J., Soberon, M. y Bravo, A. (2007) Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* 28 1: 169-173
- Gonzalez, J. M., Jr., Dulmage, H. T. y Carlton, B. C. (1981) Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* 5 3: 352-365
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J. L., Brousseau, R. y Cygler, M. (1995) *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *Journal of Molecular Biology* 254 3: 447-464
- Guo, S., Ye, S., Liu, Y., Wei, L., Xue, J., Wu, H., Song, F., et al. (2009) Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *J Struct Biol* 168 2: 259-266
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., Bendahman, N. y Hamers, R. (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363 6428: 446-448
- Harmsen, M. M. y De Haard, H. J. (2007) Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77 1: 13-22
- Herrero, S., Gechev, T., Bakker, P. L., Moar, W. J. y de Maagd, R. A. (2005) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. *BMC Genomics* 6 96
- Hua, G., Zhang, R., Bayyareddy, K. y Adang, M. J. (2009) *Anopheles gambiae* alkaline phosphatase is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis jegasan* Cry11Ba toxin. *Biochemistry* 48 41: 9785-9793
- Hui, F., Scheib, U., Hu, Y., Sommer, R. J., Aroian, R. V. y Ghosh, P. (2012) Structure and glycolipid binding properties of the nematocidal protein Cry5B. *Biochemistry* 51 49: 9911-9921

- Jurat-Fuentes, J. L., Gahan, L. J., Gould, F. L., Heckel, D. G. y Adang, M. J. (2004) The HevCaLP protein mediates binding specificity of the Cry1A class of *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Biochemistry* 43 44: 14299-14305
- Knight, P. J. K., Crickmore, N. y Ellar, D. J. (1994) The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A(C) Delta-endotoxin in the brush-border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase-N. *Molecular Microbiology* 11 3: 429-436
- Koller, C. N., Bauer, L. S. y Hollingworth, R. M. (1992) Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* native delta-endotoxin crystals. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 184 2: 692-699
- Lacoursière, J. O. y Boisvert, J. (2004) Le *Bacillus thuringiensis* *israelensis* et le contrôle des insectes piqueurs au québec Ministère de l'Environnement du Québec Québec, Canada
- Li, J. D., Carroll, J. y Ellar, D. J. (1991) Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353 6347: 815-821
- Liang, Y., Patel, S. S. y Dean, D. H. (1995) Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* Cry1A delta-endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *The Journal of Biological Chemistry* 270 42: 24719-24724
- Lorence, A., Darszon, A. y Bravo, A. (1997) Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes. *Febs Letters* 414 2: 303-307
- Luo, K., Sangadala, S., Masson, L., Mazza, A., Brousseau, R. y Adang, M. J. (1997) The *heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase functions as "receptor A" by mediating specific *Bacillus thuringiensis* Cry1A delta-endotoxin binding and pore formation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27 8-9: 735-743
- Martin, M. M. y Martin, J. S. (1984) Surfactants: their role in preventing the precipitation of proteins by tannins in insect guts. *Oecologia* 61 342-345
- Martins, E. S., Monnerat, R. G., Queiroz, P. R., Dumas, V. F., Braz, S. V., de Souza Aguiar, R. W., Gomes, A. C., et al. (2010) Midgut GPI-anchored proteins with alkaline phosphatase activity from the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) are putative receptors for the Cry1B protein of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40 2: 138-145
- McNall, R. J. y Adang, M. J. (2003) Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33 10: 999-1010
- Meadows, M. P., Ellis, D. J., Butt, J., Jarrett, P. y Burges, H. D. (1992) Distribution, Frequency, and Diversity of *Bacillus thuringiensis* in an Animal Feed Mill. *Applied and Environmental Microbiology* 58 4: 1344-1350
- Moreland, J. L., Gramada, A., Buzko, O. V., Zhang, Q. y Bourne, P. E. (2005) The Molecular Biology Toolkit (MBT): a modular platform for developing molecular visualization applications. *BMC Bioinformatics* 6 21
- Morin, S., Biggs, R. W., Sisterson, M. S., Shriver, L., Ellers-Kirk, C., Higginson, D., Holley, D., et al. (2003) Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100 9: 6
- Morse, R. J., Yamamoto, T. y Stroud, R. M. (2001) Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure* 9 5: 409-417

- Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J. A. y Hamers, R. (1994) Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Engineering* 7 9: 1129-1135
- Nakanishi, K., Yaoi, K., Nagino, Y., Hara, H., Kitami, M., Atsumi, S., Miura, N. y Sato, R. (2002) Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella* - their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin. *Febs Letters* 519 1-3: 215-220
- Nakasu, E. Y., Firmino, A. A., Dias, S. C., Rocha, T. L., Ramos, H. B., Oliveira, G. R., Lucena, W., Carlini, C. R. y Grossi-de-Sa, M. F. (2010) Analysis of Cry8Ka5-binding proteins from *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) midgut. *Journal of Invertebrate Pathology* 104 3: 227-230
- Ning, C., Wu, K., Liu, C., Gao, Y., Jurat-Fuentes, J. L. y Gao, X. (2010) Characterization of a Cry1Ac toxin-binding alkaline phosphatase in the midgut from *Helicoverpa armigera* (Hubner) larvae. *Journal of Insect Physiology* 56 6: 666-672
- Ochoa-Campuzano, C., Real, M. D., Martinez-Ramirez, A. C., Bravo, A. y Rausell, C. (2007) An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362 2: 437-442
- Oppert, B., Dowd, S. E., Bouffard, P., Li, L., Conesa, A., Lorenzen, M. D., Toutges, M., et al. (2012) Transcriptome profiling of the intoxication response of *Tenebrio molitor* larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin. *PLoS One* 7 4: e34624
- Pacheco, S., Gomez, I., Arenas, I., Saab-Rincon, G., Rodriguez-Almazan, C., Gill, S. S., Bravo, A. y 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. *Journal of Biological Chemistry* 284 47: 32750-32757
- Park, Y., Abdullah, M. A., Taylor, M. D., Rahman, K. y Adang, M. J. (2009) Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa and Cry3Bb toxicities to coleopteran larvae by a toxin-binding fragment of an insect cadherin. *Applied and Environmental Microbiology* 75 10: 3086-3092
- Parker, M. W. y Feil, S. C. (2005) Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 88 1: 91-142
- Pigott, C. R. y Ellar, D. J. (2007) Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71 2: 255-281
- Rajagopal, R., Agrawal, N., Selvapandiyan, A., Sivakumar, S., Ahmad, S. y Bhatnagar, R. K. (2003) Recombinantly expressed isoenzymic aminopeptidases from *Helicoverpa armigera* (American cotton bollworm) midgut display differential interaction with closely related *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. *Biochemical Journal* 370 971-978
- Rajagopal, R., Sivakumar, S., Agrawal, N., Malhotra, P. y Bhatnagar, R. K. (2002) Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 277 49: 46849-46851

- Rajamohan, F., Cotrill, J. A., Gould, F. y Dean, D. H. (1996)** Role of domain II, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* CryIAb delta-endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. *The Journal of Biological Chemistry* 271 5: 2390-2396
- Rausell, C., Garcia-Robles, I., Sanchez, J., Munoz-Garay, C., Martinez-Ramirez, A. C., Real, M. D. y Bravo, A. (2004)** Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Biochim Biophys Acta* 1660 1-2: 99-105
- Rausell, C., Ochoa-Campuzano, C., Martinez-Ramirez, A. C., Bravo, A. y Real, M. D. (2007)** A membrane associated metalloprotease cleaves Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin reducing pore formation in Colorado potato beetle brush border membrane vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768 9: 2293-2299
- Sangadala, S., Walters, F. S., English, L. H. y Adang, M. J. (1994)** A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and 86Rb(+)-K⁺ efflux in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 269 13: 10088-10092
- Sayed, A., Nekl, E. R., Siqueira, H. A., Wang, H. C., Ffrench-Constant, R. H., Bagley, M. y Siegfried, B. D. (2007)** A novel cadherin-like gene from western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae), larval midgut tissue. *Insect Molecular Biology* 16 5: 591-600
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. y Dean, D. H. (1998)** *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews* 62 3: 775-806
- Schwartz, J. L., Lu, Y. J., Sohnlein, P., Brousseau, R., Laprade, R., Masson, L. y Adang, M. J. (1997)** Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. *FEBS Letters* 412 2: 270-276
- Sekar, V. (1988)** The Insecticidal crystal protein gene is expressed in vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Current Microbiology* 17 6: 347-349
- Smith, G. P. y Ellar, D. J. (1994)** Mutagenesis of 2 surface-exposed loops of the *Bacillus thuringiensis* CryIc delta-endotoxin affects insecticidal specificity. *Biochemical Journal* 302 611-616
- Upadhyay, S. K. y Singh, P. K. (2011)** Role of alkaline phosphatase in insecticidal action of Cry1Ac against *Helicoverpa armigera* larvae. *Biotechnology Letters* 33 10: 2027-2036
- Valaitis, A. P., Mazza, A., Brousseau, R. y Masson, L. (1997)** Interaction analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with two aminopeptidases from gypsy moth midgut brush border membranes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27 6: 529-539
- Waalwijk, C., Dullemans, A. M., Vanworkum, M. E. S. y Visser, B. (1985)** Molecular cloning and the nucleotide sequence of the Mr 28000 crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Nucleic Acids Research* 13 22: 8207-8217
- Wolfersberger, M. G. (1990)** The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. *Experientia* 46 5: 475-477
- Wu, D. y Aronson, A. I. (1992)** Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin involved in toxicity and specificity. *The Journal of Biological Chemistry* 267 4: 2311-2317

- Wu, S. J. y Dean, D. H. (1996)** Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIIIa delta-endotoxin. *Journal of Molecular Biology* 255 4: 628-640
- Wu, S. J., Koller, C. N., Miller, D. L., Bauer, L. S. y Dean, D. H. (2000)** Enhanced toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3A delta-endotoxin in coleopterans by mutagenesis in a receptor binding loop. *FEBS Letters* 473 2: 227-232
- Yaoi, K., Kadotani, T., Kuwana, H., Shinkawa, A., Takahashi, T., Iwahana, H. y Sato, R. (1997)** Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *European Journal of Biochemistry* 246 3: 652-657
- Yu, C. G., Mullins, M. A., Warren, G. W., Koziel, M. G. y Estruch, J. J. (1997)** The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Applied and Environmental Microbiology* 63 2: 532-536
- Zhang, R., Hua, G., Andacht, T. M. y Adang, M. J. (2008)** A 106-kDa aminopeptidase is a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Biochemistry* 47 43: 11263-11272
- Zhang, X. B., Candas, M., Griko, N. B., Taussig, R. y Bulla, L. A. (2006)** A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 26: 9897-9902
- Zuniga-Navarrete, F., Gomez, I., Pena, G., Bravo, A. y Soberon, M. (2013)** A *Tenebrio molitor* GPI-anchored alkaline phosphatase is involved in binding of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa to brush border membrane vesicles. *Peptides* 41 81-86
- Zúñiga-Navarrete, F., Bravo, A., Soberón, M. y Gómez, I. (2012)** Role of GPI-Anchored membrane receptors in the mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins Capítulo: 23 En: Integrated Pest Management and Pest Control - Current and Future Tactics. 978-953-51-0050-8 Editado por: M. L. Larramendy and S. Soloneski Publicado por: InTech

Anexo I

Publicación derivada directamente del presente proyecto

A Tenebrio molitor GPI-anchored alkaline phosphatase is involved in binding of
Bacillus thuringiensis Cry3Aa to brush border membrane vesicles

Fernando Zúñiga-Navarrete, Isabel Gómez, Guadalupe Peña, Alejandra Bravo, Mario Soberón
Peptides 41 (2013) 81-86

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Peptides

journal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides

A *Tenebrio molitor* GPI-anchored alkaline phosphatase is involved in binding of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa to brush border membrane vesicles

Fernando Zúñiga-Navarrete^a, Isabel Gómez^a, Guadalupe Peña^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 Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca 62209, Morelos, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 April 2012

Received in revised form 23 May 2012

Accepted 30 May 2012

Available online 26 June 2012

Keywords:

Bacillus thuringiensis

Cry toxins

Alkaline phosphatase

GPI-anchored proteins

Toxin–receptor interaction

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis Cry toxins recognize their target cells in part by the binding to glycosyl–phosphatidyl–inositol (GPI) anchored proteins such as aminopeptidase-N (APN) or alkaline phosphatases (ALP). Treatment of *Tenebrio molitor* brush border membrane vesicles (BBMV) with phospholipase C that cleaves out GPI-anchored proteins from the membranes, showed that GPI-anchored proteins are involved in binding of Cry3Aa toxin to BBMV. A 68 kDa GPI-anchored ALP was shown to bind Cry3Aa by toxin overlay assays. The 68 kDa GPI-anchored ALP was preferentially expressed in early instar larvae in comparison to late instar larvae. Our work shows for the first time that GPI-anchored ALP is important for Cry3Aa binding to *T. molitor* BBMV suggesting that the mode of action of Cry toxins is conserved in different insect orders.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Bacillus thuringiensis produces insecticidal proteins named Cry toxins that are widely used in the control of insect pests in agriculture and for the control of vectors of human diseases [5]. Cry toxins are classified based on their amino acid sequence similarity and have different members that show insecticidal activity against different insect orders [5]. Phylogenetic analysis of the Cry gene family have grouped these toxins in at least four non-related group of proteins where the three domain (3D) group is the better characterized regarding to their mode of action in different insect orders [5].

3D-Cry proteins are pore-forming toxins that are composed of a three-domain structure. Domain I is the pore-forming domain composed of a seven α -helix bundle involved in membrane-insertion and oligomerization, while domain II and domain III are β -domains that are involved in recognition of larval midgut proteins [3]. One of the most interesting characteristics of 3D-Cry proteins is their exquisite specificity that is mainly due to the specific recognitions of different insect midgut proteins [5]. 3D-Cry proteins are synthesized as protoxins that can be divided in two groups depending on the size of the protoxin where large protoxins are 130 kDa proteins that are processed by larval gut proteases in the amino (20–50 amino acids) and carboxyl-terminal ends (around 600 amino acids)

to yield a 60 kDa toxin that is composed by the three domain structure. In contrast short protoxins are 70 kDa proteins that are only processed at the amino terminal end to yield the 60-kDa three-domain structure [3]. Cry3Aa is a short protoxin that is active against different Coleopteran larvae including *Tenebrio molitor*, yellow mealworm.

Different Cry binding proteins have been identified in the midgut membranes from different insect orders [22]. Among them, glycosyl–phosphatidyl–inositol (GPI) anchored proteins such as aminopeptidase-N (APN) or alkaline phosphatases (ALP) have been shown to be important for Cry1A toxicity against lepidopteran species or Cry11Aa and Cry4Ba toxins against certain dipteran insects [11,12]. Also, cadherin like proteins have been shown to be involved in toxicity of Cry1A and Cry11Aa toxins. Interestingly it was recently shown that Cry4Ba does not rely on cadherin binding for *Aedes aegypti* toxicity [23]. Cadherin has been also identified as binding site for the coleopteran specific Cry3Aa toxin [10,21]

It has been proposed that GPI-anchored proteins fulfill two roles on the mode of action of Cry toxins, since GPI-anchored proteins are high abundant enzymes involved in gut physiology, they mediate the low-affinity first binding interaction of monomeric Cry toxins to concentrate toxin in the midgut epithelium brush border membranes. After this binding interaction monomeric Cry toxins bind the less abundant cadherin protein with high affinity facilitating further proteolysis of the amino terminal region of the protein including α -helix 1 of domain I, triggering toxin oligomerization. The second role of GPI-anchored proteins has been proposed to be the binding of the Cry toxin oligomers with high affinity facilitating

* Corresponding author. Tel.: +52 7773291618; fax: +52 7773172388.
E-mail address: mario@ibt.unam.mx (M. Soberón).

oligomer membrane insertion in membrane microdomains leading to pore formation that break down the cells by osmotic shock lysis resulting in the disruption of the midgut epithelium and the death of the larvae [1,4,20].

In the case of the coleopteran specific Cry3Aa toxin it has been shown that in the midgut of *T. molitor* the cadherin receptor binds the toxin and facilitates oligomerization similarly to the Cry1A and Cry11Aa toxins [10]. Moreover, silencing *T. molitor* cadherin gene resulted in a tolerant phenotype demonstrating the role of this protein as receptor of Cry3Aa [10]. However, no GPI-anchored proteins have been shown to bind Cry3Aa in *T. molitor* or in other coleopteran susceptible species and it has been suggested that *T. molitor* larvae do not produce midgut GPI-anchored ALP [6]. In this manuscript we show that GPI-anchored proteins are involved in Cry3Aa binding to *T. molitor* brush border membrane vesicles. We identified a GPI-anchored 68 kDa ALP that binds Cry3Aa and characterized this binding interaction including the expression of this binding protein during larval development. These results indicate that the mode of action of Cry3Aa in *T. molitor* larvae is similar to that described in lepidopteran and dipteran insects and also suggest that ALP is a Cry binding molecule that has an important role in toxin action in three different insect orders.

2. Methods

2.1. Toxin purification and labeling

B. thuringiensis var. *tenebrionis* was grown in nutrient sporulation medium for 72 h at 30 °C with shaking at 250 rpm. The crystal inclusions were recovered, purified by discontinuous sucrose gradients, solubilized in carbonate buffer (10 mM, pH 10.5, 0.2% (v/v) β -mercaptoethanol) for 12 h and the protoxin activated with chymotrypsin (2:1 (v/v) protease:protoxin in carbonate buffer, pH 9) (Sigma) for 12 h. The activation was stopped by 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) addition and the resulting toxin was purified by anion exchange chromatography eluting by a 10–60% NaCl gradient in 50 mM Tris–HCl pH 8.5 buffer.

Activated toxin was dialyzed against borate buffer (0.05 M boric acid, 0.05 M NaOH, 0.15 M NaCl pH 8.6) and labeled with biotin (GE Healthcare) following the manufacturer specifications.

2.2. Brush border membrane vesicles (BBMV) purification

T. molitor larvae were provided by Dr. Guadalupe Peña (Centro de Investigaciones Biológicas UAEM, Cuernavaca México). Early or late instar larvae (approximately 0.05 or 0.12 g/larva respectively) were dissected and the obtained whole guts placed in cold dissection buffer (300 mM mannitol, 17 mM Tris–HCl, 5 mM EGTA, 2 mM DTT, 0.5 mM PMSF). BBMV were purified by 24 mM MgCl₂ precipitation in BBMV buffer (300 mM mannitol, 17 mM Tris–HCl, 5 mM EGTA, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 100 μ g/mL leupeptin, 150 μ g/mL pepstatin, 0.1 mM PMSF, 2.4 μ g/mL neomycin sulfate, pH 7.4). Briefly, homogenated midguts were precipitated 20 min in 24 mM MgCl₂ and then centrifuged at 2600 \times g and the supernatant was subjected to two rounds of precipitation as above followed by centrifugation at 31,000 \times g. The resulting proteins in the BBMV were quantified by Lowry protein assay (Bio-Rad) and stored at –70 °C.

2.3. Phospholipase C-treatment of BBMV

T. molitor BBMV were washed twice before treatment by ultracentrifugation at 150,000 \times g 30 min, 5 °C and suspended in BBMV buffer. The resulting BBMV were quantified by the Lowry assay. One unit of PI-PLC (phospholipase-C) from *Bacillus cereus* (Sigma) was added to 100 μ g BBMV and incubated for 2 h at 30 °C. The

GPI-anchored proteins were separated from the rest of the BBMV proteins by ultracentrifugation at 215,000 \times g for 30 min, 5 °C.

2.4. Qualitative binding assays with isolated BBMV

Binding analyses were performed in 100 μ L of binding buffer (PBS, 0.1% (v/v) Tween 20, pH 7.6). Briefly, 5 μ g of BBMV proteins were incubated with 2.5 nM biotinylated Cry3Aa toxin, and the unbound toxin was removed by centrifugation for 20 min at 20,800 \times g. The pellet containing BBMV and the bound biotinylated toxin was washed twice by centrifugation in 100 μ L of binding buffer. Finally, BBMV containing the bound toxin were suspended in 10 μ L of PBS, pH 7.6, and half volume of 2 \times sample loading buffer (0.125 M Tris–HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue) was added. The samples were separated by 10% SDS–polyacrylamide gels and electrotransferred to PVDF membranes (Bio-Rad). The biotinylated protein on the blots was visualized by incubating with streptavidin–peroxidase conjugate (Millipore) in PBS–Tween 20 (PBS-T) (0.1%) diluted 1:100,000 for 1 h, followed by luminol (Millipore). For competition experiments BBMV were incubated with 2.5 nM biotinylated Cry3Aa toxin plus 100, 250 or 500 molar excesses of unlabeled Cry3Aa or Cry1Ab toxins. For the Cry3Aa binding to PI-PLC shaved BBMV, 5 μ g of protein of the pellet resulting from the separation of the GPI-anchored proteins from the rest of the BBMV proteins after phospholipase C-treatment were incubated with biotinylated Cry3Aa.

2.5. In gel ALP activity assay

BBMV or the GPI-anchored protein fraction resulting from PI-PLC treatment (supernatant) were mixed with non-denaturing charging buffer (40% glycerol, 0.5 M Tris–HCl pH 6.8, bromophenol blue) and separated in 10% SDS–PAGE. The gel was washed in PBS twice, incubated in developing buffer (100 mM Tris–HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ pH 9.5) for 20 min and then transferred to fresh developing buffer plus 0.75% (v/v) NBT (nitro blue tetrazolium 5% (w/v) in dimethylformamide–water 70% (v/v)) and 0.35% (v/v) BCIP (5% (w/v) 5-bromo-4-chloro-3-indol-L-phosphate in dimethylformamide) (Sigma) as substrates until development of violet precipitate. The reaction was stopped by substitution of the developing buffer with 250 mM EDTA pH 8.0.

For the ALP inhibition assay the developing buffer was sodium acetate buffer (35.7% (v/v) 0.1 M acetic acid, 64.3% (v/v) 0.1 M sodium acetate pH 5) plus the ALP substrates described above.

2.6. Toxin overlay assays

For protein blot analysis, 5 μ g of BBMV protein were separated by 10% SDS–PAGE and electrotransferred to Hybond ECL membrane (Amersham). After blocking with BSA 1%, the membranes were incubated for 2 h with 2.5 nM biotinylated Cry3Aa toxin in incubation buffer (PBS-T, BSA 0.2%). Unbound toxin was removed by washing twice the membrane with PBS-T for 15 min, and the bound toxin was visualized by incubation with streptavidin–peroxidase conjugate (1:100,000) for 1 h followed by luminol (Millipore).

For the protein blot analysis of GPI-anchored proteins, the supernatant resulting from treatment of BBMV with PI-PLC was mixed with non-denaturing charging buffer, separated by 10% SDS–PAGE, electro-transferred to Hybond ECL membrane and treated as above.

For toxin overlay assay of the protein with ALP activity, we excised the violet precipitate after ALP in situ reaction from the gel and the protein was eluted in bi-distilled water for 12 h with gentle agitation. The protein was concentrated with a 10,000 NMWL

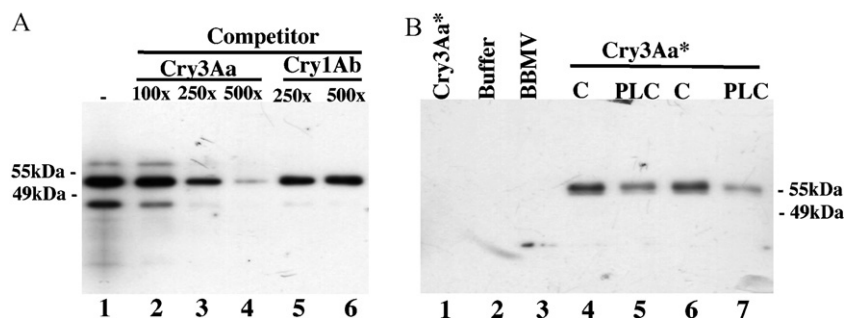


Fig. 1. Binding of Cry3Aa toxin to *T. molitor* BBMV is specific and depends on GPI-anchored proteins. (A) Qualitative binding of 2.5 nM biotinylated-Cry3Aa to 5 µg *T. molitor* BBMV. Lane 1, binding of Cry3Aa to BBMV; lanes 2–4, binding of Cry3Aa in the presence of 100-, 250- and 500-fold molar excess of unlabeled Cry3Aa respectively; lanes 5 and 6, binding of Cry3Aa in the presence of 250- and 500-fold molar excess of unlabeled lepidopteran specific Cry1Ab. (B) Qualitative binding assay of 2.5 nM biotinylated-Cry3Aa to 10 µg of *T. molitor* shaved BBMV after treatment with PIPLC. Lane 1, negative control of biotinylated Cry3Aa without BBMV; lane 2, negative control without biotinylated Cry3Aa and without BBMV; lane 3, negative control of BBMV without biotinylated Cry3Aa; lanes 4 and 6, binding of biotinylated Cry3Aa to BBMV; lanes 5 and 7, binding of biotinylated Cry3Aa to shaved BBMV treated with PIPLC.

centricon (Millipore), separated by 10% SDS–PAGE, electro-transferred to ECL membrane and treated as above.

3. Results

3.1. GPI-anchored proteins are involved in binding to *T. molitor* BBMV

We analyzed the binding of Cry3Aa toxin with BBMV obtained from *T. molitor*. Qualitative binding analyses showed that the interaction between biotinylated-Cry3Aa and *T. molitor* BBMV was specific since the incubation with increasing amounts of unlabeled Cry3Aa showed a marked decrease in the detected 55 kDa signal to almost no interaction with 500 molar excess of non-labeled Cry3Aa competitor. Moreover, the heterologous competition with the unrelated lepidopteran active Cry1Ab toxin showed no significant decrease in the 55 kDa band that showed the interaction between biotinylated-Cry3Aa and BBMV (Fig. 1).

To analyze the involvement of the GPI-anchored proteins in the interaction of Cry3Aa with *T. molitor* BBMV, BBMV were incubated with phosphatidyl inositol phospholipase-C (PLPC) enzyme, which specifically removes GPI-anchored proteins out of the membranes by cleaving the GPI anchor. The PLPC treated BBMV (shaved) were separated from the GPI-anchored proteins by ultracentrifugation. We performed binding analyses with biotinylated Cry3Aa toxin and compared the binding between the labeled toxin with non-treated BBMV and shaved BBMV.

As shown in Fig. 1B the binding capacity of labeled 55 kDa Cry3Aa toxin to shaved BBMV was greatly reduced compared to non-treated BBMV. This result reveals the importance of GPI-anchored proteins in the binding of Cry3Aa with *T. molitor* BBMV.

3.2. Different GPI-anchored proteins bind Cry3Aa toxin

In order to characterize the GPI-anchored proteins that bind Cry3Aa toxin we performed overlay binding assays of biotin labeled Cry3Aa against total BBMV proteins and also against proteins that were released after treatment of BBMV with PLPC. Fig. 2A shows that Cry3Aa binds to twelve proteins of different sizes ranging from 28 to 120 kDa. Fig. 2B shows that Cry3Aa bound to 7 GPI-anchored proteins of 120, 110, 85, 68, 60, 40 and 30 kDa molecular size. The GPI-anchored ALP proteins from different insect species have sizes of 65–68 kDa in [11,15,17] while GPI-anchored APN proteins have sizes of 110–120 kDa, suggesting that these proteins may be found in the *T. molitor* fraction containing GPI-anchored proteins.

3.3. A GPI-anchored ALP of 68 kDa binds Cry3Aa

A previous work demonstrated that an acid phosphatase is more active than ALP in *T. molitor* guts [13]. In this work ALP was identified by performing *in gel* activity assays after separation of BBMV proteins by SDS–PAGE under mild denaturation conditions (see Section 2). Fig. 3 shows a single band of 90 kDa in BBMV and a slightly higher molecular band of 100 kDa in the GPI-anchored protein fraction that showed ALP activity. It is important to mention that proteins show a different migration pattern under this electrophoresis condition. To determine if the activity detected was due in fact to the ALP and not to an acid phosphatase a sample of GPI-anchored proteins was subject to SDS–PAGE under mild denaturation conditions and part of the sample was incubated in alkaline buffer (pH 9.5) while the other under acidic conditions (pH 5) and

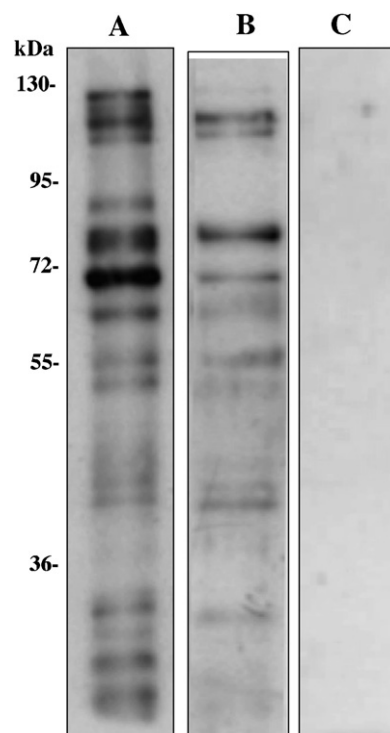


Fig. 2. Cry3Aa toxin binds to several *T. molitor* BBMV proteins. Toxin overlay assays of biotinylated Cry3Aa to *T. molitor* BBMV. (A) Cry3Aa binding to total BBMV. (B) Cry3Aa binding to GPI-anchored proteins from BBMV. (C) Detection of biotinylated proteins in *T. molitor* BBMV with the streptavidin–peroxidase complex.

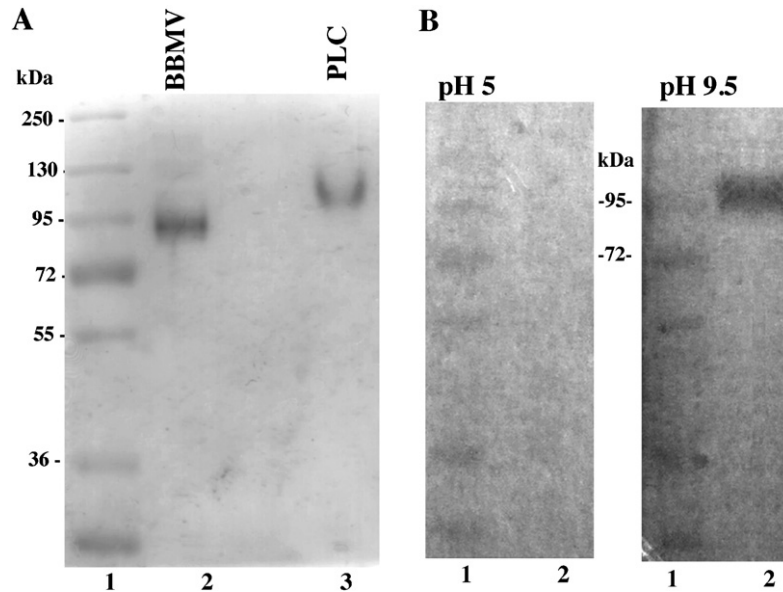


Fig. 3. Detection of a GPI-anchored alkaline phosphatase in *T. molitor* BBMV. (A) In gel alkaline phosphatase assay. Lane 1, whole *T. molitor* BBMV; lane 2, membrane GPI-anchored proteins from *T. molitor* BBMV obtained after treatment with PLP-C. (B) Phosphatase activity of GPI-anchored proteins in acidic (pH 5) or alkaline conditions (pH 9.5). Lane 1 Molecular weight marker. Lane 2 GPI-anchored proteins from *T. molitor*.

phosphatase activity was determined as above. Fig. 3B shows that phosphatase activity was only detected in the alkaline buffer indicating that the GPI-anchored protein identified is an ALP that is inhibited in acidic conditions as previously reported [13].

To determine if the Cry3Aa toxin binds to GPI-anchored ALP, a sample of GPI-anchored proteins with ALP activity was transferred to an ECL membrane and subjected to toxin overlay assay against biotinylated-Cry3Aa. Fig. 4A shows that the biotinylated-Cry3Aa was able to bind to the 100 kDa GPI-anchored ALP protein.

To determine the molecular size of the Cry3Aa ALP binding molecule, the 100 kDa protein band from the SDS-PAGE under mild denaturation conditions that showed ALP activity was eluted from the gel and subjected to normal denaturant SDS-PAGE electrophoresis and blotted to ECL membranes for ligand blot against

biotinylated-Cry3Aa. Fig. 4B shows that the 100 kDa band from SDS-PAGE under mild denaturation conditions was resolved in two bands of 60 and 68 kDa under SDS-PAGE denaturant conditions. The Cry3Aa bound to these two bands of 60 and 68 kDa suggesting that the 68 kDa is a GPI-anchored ALP.

3.4. The GPI-anchored ALP is differentially expressed during *T. molitor* larval development

To determine if the 68 kDa GPI-anchored ALP in *T. molitor* is expressed in different larval instars, we purified and analyzed BBMV from two different larval instars. We compared the Cry3Aa toxin binding profile of late instar (120–150 mg/larvae) and that from the early instar larvae used through this work (5 mg/larvae).

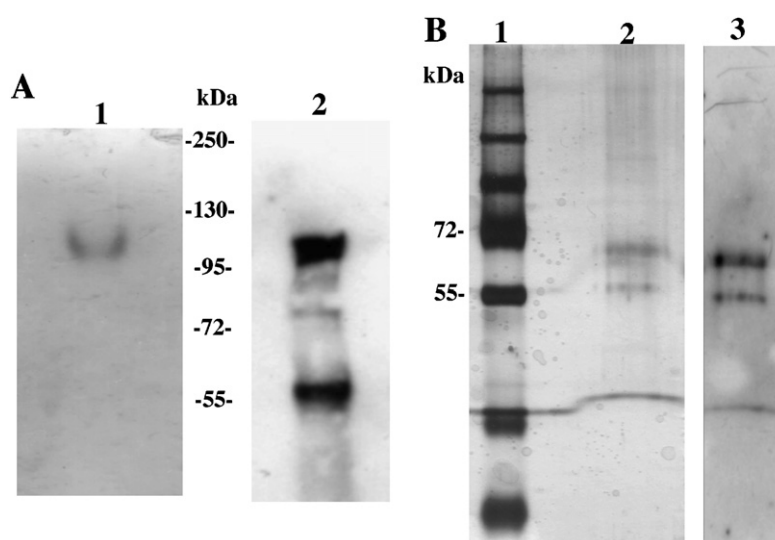


Fig. 4. *T. molitor* alkaline phosphatase binds Cry3Aa toxin. (A) Toxin overlay assay of Cry3Aa toxin to proteins with alkaline phosphatase activity obtained after PLP-C treatment of *T. molitor* BBMV. Lane 1, alkaline phosphatase *in gel* activity assay (semi-denaturant conditions) of GPI-anchored proteins from *T. molitor*; lane 2, binding of Cry3Aa toxin to GPI-anchored proteins by toxin overlay assay in the same electrophoresis conditions as lane 1. (B) Size of alkaline phosphatase active proteins that binds Cry3Aa toxin. Lane 1, molecular weight marker; lane 2, silver stained proteins under denaturant conditions that were eluted from the 100 kDa band with alkaline phosphatase activity observed under semi-denaturant conditions (Panel A, lane 1); lane 3, Cry3Aa toxin overlay assay for proteins obtained as in lane 2.

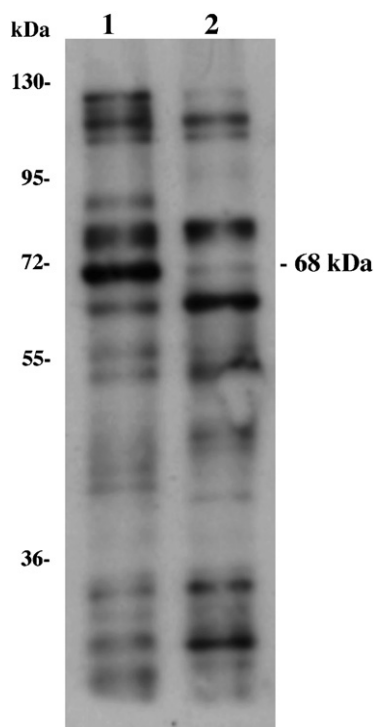


Fig. 5. *T. molitor* alkaline phosphatase is preferentially expressed in early instar larvae. Toxin overlay assay for *T. molitor* BBMV obtained from two different instar larvae. Lane 1, binding to early instar larvae (size 5–7 mg/larvae); lane 2, binding to late instar larvae (size 120–150 mg/larvae). Note that the 68 kDa band is preferentially observed in young instar larvae.

Fig. 5 shows a ligand blot of biotin labeled Cry3Aa to BBMV of the two larval instars showing that the 68 kDa band is preferentially observed in BBMV from young instar larvae (Fig. 5, lane 1) in comparison to BBMV from late instar larvae (Fig. 5, lane 2).

4. Discussion

The conserved three-dimensional structure of 3D-Cry toxins with different insect specificities suggests that the mode of action of these toxins might be conserved in the different insect orders. In fact insect cadherins have been shown to play a similar role in binding and facilitating oligomerization of Cry1A, Cry11Aa and Cry3Aa in lepidopteran, dipteran and coleopteran insects, respectively [7,10,23,25]. However, in the case of GPI-anchored proteins, known as putative receptors for Cry toxins in lepidopteran [14,15] and dipteran insects [8,11] the role of these molecules on Cry3Aa binding and toxicity has not been analyzed before. In the case of the Cry8Ka toxic to certain coleopteran pests, a GPI-anchored ALP was shown to be involved in binding to *Anthonomus grandis* BBMV [16].

Qualitative binding assays of Cry3Aa with *T. molitor* BBMV showed that GPI-anchored proteins are involved in Cry3Aa binding to brush border membranes since shaving GPI-anchored proteins with PLPC-treatment of BBMV, reduced binding of Cry3Aa. Toxin overlay assays showed seven potential GPI-anchored proteins that probably contribute to the interaction between Cry3Aa and *T. molitor* BBMV. Among these, the 120 kDa protein reminds the previously Cry3Aa binding protein early reported by Belfiore et al. [2] whose identity was never further analyzed, while the fainter closely lower 110 kDa band could be a degradation product. The 120 kDa size is similar to previously reported aminopeptidases found in *Manduca sexta*, *Bombyx mori* or *A. aegypti* [8,14,26]. Nevertheless, a single molecular species of a membrane-bound 90 kDa

aminopeptidase that does not bind Cry3Aa toxin in *T. molitor* was previously identified [9].

The two bands of 60 and 68 kDa from *T. molitor* BBMV that were identified in this work and that bound Cry3Aa toxin, show similar molecular weights to 58 and 66 kDa proteins ambiguously identified before as α -amylase and ATPase respectively by Bulushova et al. [6]. However, ALP in lepidopteran and dipteran insects shows similar molecular weight of 68 kDa and a degradation product of 62 kDa [11,15,17]. Our data shows the 68 kDa is an ALP and that the 60 kDa is most probably a degradation product of the ALP since these two proteins of 68 and 60 kDa were obtained after the 100 kDa protein band showing ALP activity was eluted from the semi-denaturant gel and analyzed by ligand blot against Cry3Aa toxin under denaturant conditions. However, further experiments are needed to demonstrate that the 60 kDa protein is a degradation product of the 68 kDa ALP. Finally the 36 kDa show a similar molecular weight as a previously identified ADAM10 metalloprotease in *Leptinotarsa decemlineata* that was shown to be involved in Cry3Aa binding [18]. However, ADAM10 metalloprotease is not GPI-anchored. The identity of the 120 kDa and the 36 kDa GPI-anchored proteins that bind Cry3Aa remains to be determined.

Previous reports indicated that ALP was not detected in *T. molitor* larval midguts [6]. Nevertheless, the determination of *T. molitor* transcriptome response to Cry3Aa showed that ALP gene expression is induced when larvae are exposed to Cry3Aa [6,19]. In addition, our data clearly shows that a GPI-anchored ALP is expressed in *T. molitor* larval midgut. In this work midguts were obtained from early instar larvae in contrast to midguts obtained from late instar larvae used in previous reports [6].

In two different lepidopteran species, *M. sexta* and *Helicoverpa armigera* ALP is preferentially expressed in early instar larvae that correlates with the increased susceptibility to Cry1A toxins of earlier instar larvae in comparison to late instars [1,24]. Our data shows that in the coleopteran *T. molitor* the ALP is also preferentially expressed in early instar larvae explaining the lack of detection of ALP in *T. molitor* midguts from late instar larvae [6].

Our work shows that GPI-anchored ALP is important for Cry3Aa binding to *T. molitor* BBMV and these results showed that similar midgut proteins have been selected in different insect orders to function as Cry toxin receptors and that the mode of action of Cry toxins is conserved in different insect orders. The identification of Cry toxin receptors could provide targets for improving insecticides against important insect pests and to the identification gene alleles in resistance to Cry toxins.

Acknowledgments

We thank Lizbeth Cabrera for technical assistance. Research was funded in part through grants DGAPA/UNAM IN205411-3. FZ-N acknowledge CONACyT for PhD fellowship.

References

- [1] Arenas I, Bravo A, Soberón M, Gómez I. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *J Biol Chem* 2010;285:12497–503.
- [2] Belfiore CJ, Vadlamudi RK, Osman YA, Bulla Jr LA. A specific binding protein from *Tenebrio molitor* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;200:359–64.
- [3] Bravo A, Gill SS, Soberón M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 2007;49:423–35.
- [4] Bravo A, Gómez I, Conde J, Muñoz-Garay C, Sánchez J, Miranda R, et al. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta* 2004;1667:38–46.
- [5] Bravo A, Likitvivanavong S, Gill SS, Soberón M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol* 2011;41:423–31.
- [6] Bulushova NV, Zhuzhikov DP, Lyutikova LI, Kirillova NE, Zalunin IA, Chestukhina GG. Toxin-binding proteins isolated from yellow mealworm *Tenebrio molitor* and wax moth *Galleria mellonella*. *Biochemistry (Mosc)* 2011;76:202–8.

- [7] Chen J, Aimanova KG, Fernandez LE, Bravo A, Soberon M, Gill SS. *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biochem J* 2009;191–200.
- [8] Chen J, Aimanova KG, Pan S, Gill SS. Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin. *Insect Biochem Mol Biol* 2009;39:688–96.
- [9] Cristofolletti PT, Terra WR. Specificity, anchoring, and subsites in the active center of a microvillar aminopeptidase purified from *Tenebrio molitor* (Coleoptera) midgut cells. *Insect Biochem Mol Biol* 1999;29:807–19.
- [10] Fabrick J, Oppert C, Lorenzen MD, Morris K, Oppert B, Jurat-Fuentes JL. A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. *J Biol Chem* 2009;284:18401–10.
- [11] Fernández LE, Aimanova KG, Gill SS, Bravo A, Soberón M. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem J* 2006;394:77–84.
- [12] Fernández LE, Martínez-Anaya C, Lira E, Chen J, Evans A, Hernández-Martínez S, et al. Cloning and epitope mapping of Cry11Aa-binding sites in the Cry11Aa-receptor alkaline phosphatase from *Aedes aegypti*. *Biochemistry* 2009;48:8899–907.
- [13] Ferreira C, Bellinello G, Ribeiro AF, Terra WR. Digestive enzymes associated with the glycocalyx, microvillar membranes and secretory vesicles from midgut cells of *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochem* 1990;20:839–47.
- [14] Knight PJ, Crickmore N, Ellar DJ. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol Microbiol* 1994;11:429–36.
- [15] McNall RJ, Adang MJ. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect Biochem Mol Biol* 2003;33:999–1010.
- [16] Nakasu EY, Firmino AA, Dias SC, Rocha TL, Ramos HB, Oliveira GR, et al. Analysis of Cry8Ka5-binding proteins from *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) midgut. *J Invertebr Pathol* 2010;104:227–30.
- [17] Ning C, Wu K, Liu C, Gao Y, Jurat-Fuentes JL, Gao X. Characterization of a Cry1Ac toxin-binding alkaline phosphatase in the midgut from *Helicoverpa armigera* (Hubner) larvae. *J Insect Physiol* 2010;56:666–72.
- [18] Ochoa-Campuzano C, Real MD, Martínez-Ramírez AC, Bravo A, Rausell C. An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362:437–42.
- [19] Oppert B, Dowd SE, Bouffard P, Li L, Conesa A, Lorenzen MD, et al. Transcriptome profiling of the intoxication response of *Tenebrio molitor* larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin. *PLoS One* 2012;7:e34624.
- [20] Pacheco S, Gómez I, Arenas I, Saab-Rincón G, Rodríguez-Almazán C, Gill SS, et al. 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* 2009;284:32750–7.
- [21] Park Y, Abdullah MA, Taylor MD, Rahman K, Adang MJ. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa and Cry3Bb toxicities to coleopteran larvae by a toxin-binding fragment of an insect cadherin. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:3086–92.
- [22] Pigott CR, Ellar DJ. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007;71:255–81.
- [23] Rodríguez-Almazán C, Reyes EZ, Zúñiga-Navarrete F, Muñoz-Garay C, Gómez I, Evans AM, et al. Cadherin binding is not a limiting step for *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba toxicity to *Aedes aegypti* larvae. *Biochem J* 2012; 711–7.
- [24] Upadhyay SK, Singh PK. Role of alkaline phosphatase in insecticidal action of Cry1Ac against *Helicoverpa armigera* larvae. *Biotechnol Lett* 2011;33:2027–36.
- [25] Vadlamudi RK, Weber E, Ji I, Ji TH, Bulla Jr LA. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J Biol Chem* 1995;270:5490–4.
- [26] Yaoi K, Kadotani T, Kuwana H, Shinkawa A, Takahashi T, Iwahana H, et al. Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Eur J Biochem* 1997;246:652–7.

Anexo II

Otras publicaciones

Role of GPI-anchored membrane receptors in the mode of action of Bacillus thuringiensis Cry toxins

Zúniga-Navarrete F, Bravo A, Soberón M, Gómez I.

In: Larramendy, M.L. Integrated Pest Management and Pest Control- Current and Future Tactics. Intech (2012) pags. 551-566

Cadherin binding is not a limiting step for Bacillus thuringiensis subs. israelensis Cry4Ba toxicity to Aedes aegypti larvae

Rodríguez-Almazán C, Reyes E Z, **Zúniga-Navarrete F**, Muñoz-Garay C, Gómez I, Evans A M, Likitvivatavanong S, Bravo A, Gill S S, Soberón M.
Biochem. J. (2012) 443, 711-717.

Protein-protein interaction detection on membrane supports

Flores-Escobar B, **Zúniga-Navarrete F**, Sánchez J, Gómez I (2012).

In: Gómez, I. Tools to Understand Protein-Protein Interactions. Kerala. Transworld Research Network (2012). pags. 55-70

Role of GPI-Anchored Membrane Receptors in the Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Cry Toxins

Fernando Zúñiga-Navarrete, Alejandra Bravo,
Mario Soberón and Isabel Gómez
*Instituto de Biotecnología-UNAM. Depto.
Microbiología Molecular. Cuernavaca, Morelos
Mexico*

1. Introduction

Insect pests are the major cause of damage to commercially important agricultural crops. Chemical pesticides have long-term detrimental effects, leading to irreversible damage to the environment and elimination of natural predators. Also, several hundred insect species have developed resistance to one or more chemical insecticides. There is, therefore, a need for environmentally safe pest control to maintain sustainability of the environment. *Bacillus thuringiensis* (Bt) emerged as a valuable biological alternative in pest control, because of its advantages of specific toxicity against target insects, lack of polluting residues and safety to non-target organisms such as humans, other vertebrates and plants, and is completely biodegradable. Bt has been used as a biopesticide in agriculture, forestry and mosquito control and accounts for 95% of the 1% market share of biopesticides in the total pesticide market. However, insect resistance against Bt has been reported in many cases. Insects develop resistance to insecticides through mechanisms that reduce the binding of toxins to gut receptors (de Maagd et al., 2001).

Bacillus thuringiensis Cry toxins have been widely used in the control of insect pests either as spray products or expressed in transgenic crops. These proteins are pore-forming toxins with a complex mechanism of action that involves the sequential interaction with several toxin-receptors. Cry toxins are specific against susceptible larvae and although they are often highly effective, some insect pests are not affected by them or show low susceptibility. In addition, the development of resistance threatens their effectiveness, so strategies to cope with all these problems are necessary. In this chapter we will discuss and compare the different proteins that are involved in the mechanism of action of Cry toxins with special emphasis on GPI-receptors: Aminopeptidases and alkaline phosphatases. We will discuss how the mechanism of toxin-receptor interaction has an important role to design new strategies to improve insecticidal activity of Cry toxins. In addition we will discuss other insect gut proteins that have recently been shown to bind Cry toxins and that may be involved in Cry toxin action.

2. Cry toxins

Bacillus thuringiensis (Bt) is an endospore-forming bacterium characterized by the presence of a protein crystal within the cytoplasm of the sporulating cell. Individual Cry toxin has a defined spectrum of insecticidal activity, usually restricted to a few species in one particular order of Lepidoptera (butterflies and moths), Diptera (flies and mosquitoes), Coleoptera (beetles and weevils), Hymenoptera (wasps and bees), and also to nematodes, respectively (Rajamohan et al., 1998). A few toxins have an activity spectrum that spans two or three insect orders. For example, Cry1Ba is most notably active against the larvae of moths, flies, and beetles. The combination of toxins in a given strain, therefore, defines the activity spectrum of that strain. Cry proteins are defined as: a parasporal inclusion protein from Bt that exhibits toxic effects to a target organism, or any protein that has obvious sequence similarity to a known Cry protein (Schnepf et al., 1998).

To date, the tertiary structures of seven different Cry proteins, Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4Aa, Cry4Ba and Cry8Ea have been determined by X-ray crystallography (Li et al., 1991; Grochulski et al., 1995; Galitsky et al., 2001; Morse et al., 2001; Boonserm et al., 2005; Boonserm et al., 2006; Guo et al., 2009). All these structures display a high degree of similarity with a three-domain organization (Figure 1), suggesting a similar mode of action of the Cry protein family even though they show very low amino acid sequence similarity. Cry toxins are classified by their primary amino acid sequence and more than 500 different *cry* gene sequences have been classified into 67 groups (Cry1–Cry67). They are globular molecules composed of three structural domains connected by single linkers. Domain I, a seven α -helix bundle, is implicated in membrane insertion, toxin oligomerization and pore formation. Domain II is a beta-prism of three anti-parallel β -sheets packed around a hydrophobic core with exposed loop regions that are involved in receptor recognition, and domain III, is a β -sandwich of two anti-parallel β -sheets. Both domain II and III are implicated in insect specificity by mediating specific interactions with different insect gut proteins (Bravo et al., 2007).

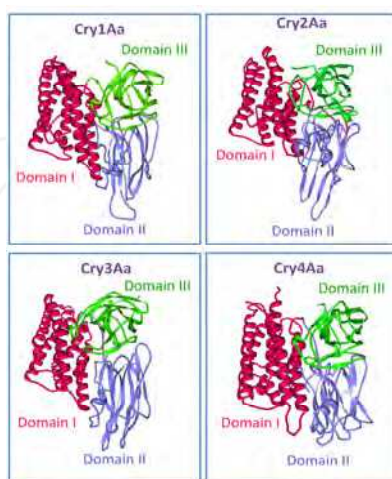


Fig. 1. Crystal structure of Cry1Aa (PDB code, 1CIY); Cry2Aa (PDB code, 115P); Cry3A (PDB code, 1DLK) and Cry4Aa (PDB code, 2C9K). Figures were generated using PyMol program.

2.1 Structure-function relationship

Domain I was immediately recognized as being equipped for pore formation, since shares structural similarities with other PFT like colicin Ia and N and diphtheria toxin, supporting the role of this domain in pore-formation. Isolated domain I fragments have been demonstrated to partition into model membranes to form pores (de Maagd et al., 2003); conversely, the domains II-III segment expressed without domain I was shown to bind to midgut membrane (Flores et al., 1997). Domain II was suspected to determine the specificity, because it represents the most divergent part of the toxin sequence, and exchanging domain II, or domains II and III, between closely related toxins has resulted in active hybrids showing altered specificity. Site-directed mutagenesis in its three hypervariable apical loops have identified residues involved in specific binding to membranes of several lepidopteran and coleopteran insects (Rajamohan et al., 1998; Schnepf et al., 1998). The specific binding consisted of reversible and irreversible steps, but only the irreversible binding is correlated with toxicity. More recent domain-exchange studies have found that toxicity of the hybrids to the insect host followed the movement of domain III, which would point to domain III as being responsible for the prerequisite step in toxicity, namely receptor binding. Site-directed mutagenesis in domain III located a small number of residues affecting membrane binding affinity and toxicity (de Maagd et al., 2001). However, direct observation of a toxin with a bound specificity determinant from the insect receptor is still needed to identify the receptor-binding site.

2.2 Molecular mode of action

The mode of action of Cry toxins has been characterized principally in lepidopteran insects and involves several steps and interactions with different receptors that depend on the oligomeric state of the toxin in a ping-pong binding mechanism. Cry1A toxins are produced as crystal inclusion bodies, which need to be ingested by the susceptible larvae to be toxic. These crystals are dissolved in the alkaline and reducing environment of the larval midgut, releasing soluble protoxins of 130 kDa. The inactive protoxins are then cleaved by midgut proteases yielding 60 kDa monomeric toxins (Soberon et al., 2009).

In figure 1, the activated monomeric toxins bind to highly abundant low affinity receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins, such as aminopeptidase N (APN) and alkaline phosphatase (ALP), localizing the toxin in the brush border microvilli. Specifically, loop 3 of domain II and β -16 of domain III are involved in this first interaction (Pacheco et al., 2009; Arenas et al., 2010). After this, the toxin binds to low abundant cadherin receptor, in a high affinity and complex interaction involving participation of loop 2, loop 3, and loop α -8 of domain II the toxin. Binding with cadherin facilitates additional protease cleavage of the N-terminal end of the toxin eliminating helix α -1 of domain I (Gomez et al., 2002). This cleavage induces assembly of an oligomeric form of the toxin. The conformational changes in toxin oligomers results in 100-fold increased binding affinity to APN and ALP receptors, through loop 2 (Bravo et al., 2004; Arenas et al., 2010). After the oligomers bind to these receptors they insert into membrane microdomains, creating pores in the apical membrane of midgut cells causing osmotic shock, bursting off the midgut cells and finally ending with the death of the insect (Soberon et al., 2009).

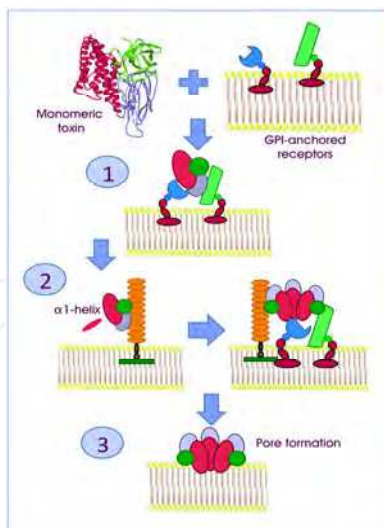


Fig. 2. Model of the mode of action of Cry toxins. 1) First interaction between monomeric toxin with low affinity-high abundant GPI-anchored receptors. 2) Second interaction occurs between monomeric toxin with cadherin receptor to induce oligomerization of the toxin. 3) The interaction of oligomeric toxin with GPI-anchored receptors result in pore formation.

2.3 Specificity=Binding receptor?

Although a given toxin has quite a narrow host range *in vivo*, *in vitro* many are non-specific and activated forms are even capable of forming pores in simple lipid bilayers. However, excessively high concentrations are required for lipid bilayer pore formation and the resulting pores have properties different than those formed in the presence of insect midgut membrane components. Many proteins have been identified in the midgut membrane that are capable of binding to Bt toxins but the ability to bind does not always correlate with susceptibility. For example, the pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) is susceptible to Cry1Ab and Cry1Ac toxins, both of which bind to a common site. A strain of pink bollworm (AZP-R) resistant to these two toxins could no longer bind Cry1Ab but, surprisingly, Cry1Ac binding was unaffected (Gonzalez-Cabrera et al., 2003). One explanation for such a result is that not all toxin binding is productive; that is, not all toxin binding results in pore-formation. Nevertheless, for several insect midgut proteins have been shown to have functional relevance to the toxic mechanism. The first is aminopeptidase N, whose expression in a *Drosophila* cell line resulted in an acquired susceptibility to toxin (Gill & Ellar 2002) and whose silencing by RNAi in a susceptible insect resulted in a reduced sensitivity to toxin (Rajagopal et al., 2002). Another membrane protein, cadherin, demonstrated a high toxin affinity, and mutations in cadherin genes result in a loss of sensitivity (Gahan et al., 2001; Morin et al., 2003).

3. Cry toxins receptors

As mentioned previously, Cry toxins are highly selective and kill only a limited number of insect species. This selectivity is mainly due to the interaction of Cry toxins with larval

proteins located in the midgut epithelium cells. The crucial role of this receptor binding for toxicity is emphasized by the observation that insects selected for resistance to a Cry toxin often have no or reduced binding capacity for that toxin (Ferre & Van Rie 2002). A major research effort has taken place in the identification of insect proteins that bind Cry toxins and mediate toxicity. Among these, two major types of receptors have been identified: transmembrane proteins, such as cadherins, and proteins anchored to the membrane such as the GPI-anchored proteins that have been proposed to be involved in the action of Cry toxins (Gomez et al., 2007).

3.1 What kind of molecules are receptors for Cry toxins?

After it was demonstrated that specific high-affinity toxin binding sites are present in the midgut of susceptible insects, efforts to identify and clone these molecules has been intensified. Several putative Cry toxin receptors have since been reported, of which the best characterized are the aminopeptidase N (APN) receptors and the cadherin-like receptors identified in lepidopterans. In nematodes, glycolipids are believed to be an important class of Cry toxin receptors. Other putative receptors include alkaline phosphatases (ALPs), a 270-kDa glycoconjugate, and a 252-kDa protein (Pigott & Ellar 2007).

Protein	Insect order	Species
Cadherin	Lepidoptera	<i>Manduca sexta</i> , <i>Heliothis virescens</i> , <i>Ostrinia nubilalis</i> , <i>Helicoverpa armigera</i> , <i>Bombix mori</i> , <i>Pectinophora gossypiella</i>
	Diptera	<i>Anopheles gambiae</i> , <i>Aedes aegypti</i>
	Coleoptera	<i>Tenebrio molitor</i> <i>Diabrotica virgifera virgifera</i>
BTR-270	Lepidoptera	<i>Lymantria dispar</i>
Chlorophyllide-binding protein (252 protein)	Lepidoptera	<i>Bombix mori</i>
ADAM 10 metalloprotease	Coleoptera	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>

Table 1. Receptors of Cry toxins (non-GPI anchored to the membrane) described in different insects.

3.1.1 Cadherins

Cadherin proteins represent a large family of glycoproteins that are responsible for inter-cellular contacts. These proteins are composed of an ectodomain formed by 11 to 12 cadherin repeats (CR), a transmembrane domain and an intracellular domain (Bel & Eschrich 2006). In the case of CADR of the lepidopteran *Manduca sexta*, it was shown that this protein is located in the microvilli of midgut cells (Chen et al., 2005). Cry1A toxins binds

to cadherin proteins of at least six lepidopteran species, *Manduca sexta*, *Bombyx mori*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa armigera*, *Pectinophora gossypiella* and *Ostrinia nubilalis* (Pigott & Ellar 2007).

The role of cadherin-like proteins as Cry1A toxin receptor was supported by the selection of a *Heliothis virescens* Cry1Ac-resistant line YHD2 that has a retrotransposon insertion mutation in the cadherin-like gene (Gahan et al., 2001). In addition, the characterization of CADR alleles in field-derived and in laboratory-selected Cry toxin-resistant strains of the cotton pest *Pectinophora gossypiella* (pink bollworm) revealed three mutated CADR alleles that were associated with Cry toxin resistance (Morin et al., 2003).

The interaction of Cry1A toxins with the CADR receptor is a complex process. Three regions in CADR proteins have been shown to interact with three domain II loop regions. Cry1Ab loop 2 interacts with CADR residues ⁸⁶⁵NITIHITDTNN⁸⁷⁵ located in repeat 7, whereas loops α -8 and 2 interact with CADR residues ¹³³¹IPLPASILTVTV¹³⁴² located in repeat 11. A third Cry1A binding region was located in CADR in the repeat 12. In the case of *H. virescens* cadherin, this binding epitope was narrowed to ¹⁴²³GVLTLN¹⁴³¹ and demonstrated that it interacts with Cry1Ac domain II loop 3 (Gomez et al., 2007).

A cadherin protein from *T. molitor* was identified as a Cry3Aa binding protein, and it was shown to facilitate Cry3Aa oligomer formation. Moreover, silencing of the cadherin gene by feeding dsRNA showed that the silenced beetles were resistant to Cry3Aa indicating an active role of cadherin on Cry3Aa toxicity (Fabrick et al., 2009). A cadherin protein was also identified as a Cry3Aa receptor in *Diabrotica virgifera virgifera*. A fragment of this cadherin protein containing the membrane proximal cadherin repeats 8-10 bound Cry3Aa and Cry3Bb toxins with high affinity (Kd of 12 and 1.4 nM, respectively) and enhanced Cry3Aa and Cry3Bb toxicity to different coleopteran insects (Park et al., 2009).

As in lepidopteran insects, cadherin proteins have been identified in *Ae. aegypti* and *An. gambiae* showing binding to Cry11Aa and Cry4Ba respectively (Hua et al., 2008; Chen et al., 2009). In *Ae. aegypti*, cadherin also serves a receptor of Cry11Ba toxin that was isolated from the Bt var *jegathesan* strain but showed lower affinity to Cry4Ba protein (Gill et al., 2011). An *An. gambiae* cadherin fragment containing the Cry4Ba binding site enhanced the toxicity of Cry4Ba in both *An. gambiae* and *Ae. aegypti* larvae suggesting its active role as a receptor of Cry4Ba in these mosquitoes species. In the case of *Ae. aegypti* cadherin, it was shown that an anti-cadherin antibody competed binding of Cry11Aa to *Ae. aegypti* BBMV. In both *Ae. aegypti* and *An. gambiae*, cadherin is located in the microvilli of the caeca and in the microvilli of the posterior gut cells, that are the same sites where Cry11Aa and Cry4Ba bind (Hua et al., 2008; Chen et al., 2009; Park et al., 2009)

3.2 Other molecules

In lepidopteran insects, another proteins and molecules different from cadherin have been identified as a 270 kDa glycoconjugate and a 250 kDa protein named P252 (Pigott & Ellar 2007).

The 270 kDa glycoconjugate was identified as Cry1Ac binding protein in *L. dispar* (Valaitis et al., 2001). Recently *B. mori* P252 that binds Cry1Ac was identified as a chorophyllide-binding protein (Pandian et al., 2008). In addition, glycolipids were proposed to act as Cry toxin receptors in lepidopteran insects as was demonstrated for the nematode *Caenorhabditis*

elegans (Griffitts et al., 2005). In the case of *L. decemlineata*, an ADAM 3 metalloprotease was identified as Cry3Aa receptor. Binding of Cry3Aa to ADAM-3 through domain II loop 1 enhanced Cry3Aa pore-formation activity suggesting that this binding interaction is important for Cry3Aa toxicity (Ochoa-Campuzano et al., 2007). The only GPI-anchored protein identified in coleopteran insects as a putative Cry receptor was an ALP from *A. grandis* that bound Cry1B toxin (Martins et al., 2010).

3.2.1 GPI-anchored receptors: APN, ALP and glucosidase

Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins (GPI proteins) are eukaryotic exoplasmic membrane proteins that play very diverse biological functions including hydrolytic enzyme activity, transmembrane signaling, intracellular sorting and cell adhesion interaction. Besides these biological functions, GPI proteins such as alkaline phosphatases (AP-GPI), 5-nucleotidase, dipeptidase, aminopeptidase P, have been used primarily as markers of plasma membranes during their purification procedure. Later, most of GPI proteins were found to be resistant to Triton X-100 solubilization at low temperature in kidney brush border membranes, whereas transmembrane enzymes were solubilized (Nosjean et al., 1997). Similar observations were done on brush border membranes from insects where APN and ALP are both GPI-anchored proteins; these proteins are proposed to be selectively included in lipid rafts that are conceived as spatially differentiated liquid-ordered microdomains in cell membranes. The APN and ALP in *M. sexta* and *H. virescens*, in contrast to the CADR receptors, were shown to be located in lipid rafts. The interaction of pore-forming toxins with lipid rafts could result in additional cellular events, including toxin internalization, signal transduction and cellular response (Zhuang et al., 2002; Bravo et al., 2004). In table 2 are presented the GPI-anchored proteins identified as Cry toxins receptors.

The first Cry1A toxin-binding protein that was described was an APN protein in the lepidopteran *M. sexta*. This protein was glycosylated and anchored to the membrane by a GPI anchor. Since then, other GPI-anchored APNs have been recognized as Cry toxin receptors in different lepidopteran species such as *H. virescens*, *Spodoptera litura*, *H. armigera*, *B. mori*, *Lymantria dispar*, *Plutella xylostella*, and in the dipteran *An. Quadrimaculatus*, and *A. aegypti*. Phylogenetic analyses suggest that in lepidopteran insects there are at least five different APN families and at least three of them have been shown to bind Cry1 toxins in different insect species (Gomez et al., 2007; Pigott & Ellar 2007).

The APN has been implicated in toxin insertion, since cleavage of APN by phosphatidylinositol specific phospholipase C treatment which cleaves out the GPI anchored proteins substantially decreased the levels of Cry1Ab incorporation into insoluble lipid raft membranes (Bravo et al., 2004) and drastically reduced the pore formation activity of the toxin assayed in BBMV from *Trichoplusia ni* (Lorence et al. 1997). In addition, the incorporation of APN into the lipid bilayer enhanced Cry1Aa pore formation activity (Schwartz et al., 1997). The sugar GalNAc in the APN receptor is an important epitope in the interaction with Cry1Ac toxin (Burton et al., 1999; de Maagd et al., 1999). In the case of the lepidopteran *Lymantria dispar*, it was proposed that the monomeric Cry1Ac toxin interacts with APN following a sequential binding model. In this model, APN is first recognized by domain III of Cry1Ac through the GalNAc moiety, followed by a protein-protein contact of the domain II loop region of Cry1Ac. The first contact is fast and reversible, and mutations close to a domain III cavity affect this initial binding, while mutations in domain II affect the

rate constants of the second interaction step which is slower and tighter (Jenkins et al., 2000). Li et al. reported that the binding of GalNAc to monomeric Cry1Ac correlates with an increase of temperature factors in the pore-forming domain I. However, there was no indication of a clear conformational change in the monomeric-Cry1Ac toxin (Li et al., 2001). In contrast, the fluorescence spectroscopy studies of Cry1Ac in its oligomeric state showed that GalNAc induces a conformational change in domain III of the oligomeric structure of Cry1Ac in the vicinity of the sugar pocket. The interaction of Cry1A-oligomer with GalNAc enhanced membrane insertion of the soluble pre-pore oligomeric structure, supporting the model that interaction of the Cry1A pre-pore with GPI-anchored receptors facilitates membrane insertion and pore-formation. The APN-oligomer interaction may be especially critical when low toxin protein concentrations reach the midgut epithelium, conditions that may occur *in vivo* in the larvae gut where the Cry toxins are exposed to high concentration of proteases (Pardo-Lopez et al., 2006).

A resistant *S. exigua* population that is resistant to Cry1Ca toxin was shown to lack the RNA transcript of APN-1, suggesting that this APN is involved in Cry1C toxicity to this insect species (Herrero et al., 2005). Finally, in the case of *S. litura*, silencing an APN with dsRNA resulted in a lower susceptibility to Cry1Ca toxin, also indicating a role of APN in Cry1C toxicity in this insect species (Herrero et al., 2005).

Two APN isoforms (AaeAPN1 and AaeAPN2) were identified in *Ae. aegypti* by Cry11Aa pull down experiments. Protein fragments from both APN isoforms were produced in *E. coli* and shown to inhibit binding of Cry11Aa to BBMV, suggesting their active role in Cry11Aa binding to insect membranes (Chen et al., 2009). In the case of *An. gambiae* and *An. quadrimaculatus* larvae, two APN's were also identified as Cry11Ba binding proteins. Interestingly, Cry11Ba binds both *An. quadrimaculatus* and *An. gambiae* APN molecules with a very high binding affinity of 0.56 nM and 6.4 nM respectively (Abdullah et al., 2006; Zhang et al., 2008). These results suggest that APN may have a more important role in the toxicity of Cry11Ba in these two Anopheline species. In fact, it was recently shown that certain *A. gambiae* APN protein fragments enhanced Cry11Ba toxicity as has been shown for cadherin protein fragments (Zhang et al., 2008).

In regard to the APN binding epitopes involved in Cry toxin interaction, a region of 63 residues (I135-P198) involved in Cry1Aa binding was identified in *B. mori* APN1 (Nakanishi et al., 2002). The domain III of Cry toxins is involved in the APN-Cry interaction, as shown by the interchange of domain III between Cry1Ac and Cry1Ab toxins (de Maagd et al., 1999). Domain III residues of Cry1Aa⁵⁰⁸STRVN⁵¹³ and ⁵⁸²VFTLSAHV⁵⁸⁹ were shown to be involved in binding I135-P198 APN fragment (Atsumi et al., 2005).

ALPs are found in all animals and as is expected are mainly localized in microvilli of columnar cells and of insect midgut epithelium cells (Eguchi 1995). ALPs can be divided into two groups: soluble (s-ALP) and membrane-bound (m-ALP) (Eguchi et al., 1990; Itoh et al., 1991). In insects, both ALPs are found in larval midgut epithelium cells; however, they are expressed in different cell types. The s-ALP is found exclusively in the cavity of goblet cells and in the apical region of the midgut; whereas, m-ALP is localized in the brush border membrane of columnar cells and particularly restricted to the middle and posterior midgut. Moreover, s- and m-ALPs show distinct differences in enzymatic activity (such as optimal pH) and also the structure of sugar side chain, suggesting that they perform different functions *in vivo* (Eguchi et al., 1990).

GPI-anchored Cry toxin-binding receptors (a)				
ORDER	SPECIES	PROTEIN	BINDING TOXIN	IDENTIFICATION METHOD
Lepidoptera	<i>Manduca sexta</i>	Class 1 APN	Cry1Ac ⁽¹¹⁾ , Cry1Aa, Cry1Ab ⁽¹⁴⁾	Affinity chromatography ⁽¹¹⁾ , Chromatography purification, ligand blot, SPR ⁽¹⁴⁾
		Class 2 APN	Cry1Ab5 ⁽⁵⁾	Affinity chromatography, ligand blot ⁽⁵⁾
		ALP	Cry1Ac ⁽¹⁵⁾	PLPC treatment, 2D-SDS-PAGE-Mass spectrometry ⁽¹⁵⁾
	<i>Bombix mori</i>	Class 1 APN	Cry1Aa ⁽²³⁾ , Cry1Aa, Cry1Ab ⁽¹⁶⁾	Ion exchange chromatography purification ⁽²³⁾ , Heterologous expression, toxin overlay assay ⁽¹⁶⁾
		Class 3 APN, Class 4 APN	Cry1Aa, Cry1Ab ⁽¹⁶⁾	Heterologous expression, toxin overlay assay ⁽¹⁶⁾
	<i>Helicoverpa armigera</i>	Class 1 APN	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac ⁽¹⁸⁾	Heterologous expression, toxin overlay assay ⁽¹⁸⁾
		Class 3 APN	Cry1Ac ⁽¹⁸⁾	Heterologous expression, ligand blot ⁽¹⁸⁾
		ALP	Cry1Ac ⁽²¹⁾	Anion exchange chromatography ⁽²¹⁾
	<i>Heliothis virescens</i>	Class 1 APN	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac ⁽¹³⁾ , Cry1Fa ⁽³⁾	Affinity chromatography, SPR ⁽¹³⁾ Affinity chromatography, ligand blot ⁽³⁾
		Class 3 APN	Cry1Ac ⁽⁹⁾	Affinity chromatography, ligand blot ⁽⁹⁾
		Class 4 APN	Cry1Fa ⁽³⁾	Affinity chromatography, SPR ⁽³⁾
		ALP	Cry1Ac ⁽¹⁰⁾	PLPC treatment, western blot ⁽¹⁰⁾
	<i>Lymantria dispar</i>	Class 1 APN	Cry1Ac ⁽²²⁾	Immunolocalization ⁽²²⁾
		Class 3 APN	Cry1Ac ⁽⁸⁾	Chromatographic purification ⁽⁸⁾
	<i>Plutella xylostella</i>	Class 1 APN, Class 2 APN, Class 3 APN, Class 5 APN	Cry1Aa, Cry1Ab ⁽¹⁶⁾	Heterologous expression, toxin overlay assay ⁽¹⁶⁾
Class 3 APN, Class 5 APN		Cry1C ⁽²⁾	<i>In silico</i> identification, heterologous expression, toxin overlay assay ⁽²⁾	
<i>Epiphyas postvittana</i>	Class 3 APN	Cry1Aa, Cry1Ba ⁽¹⁹⁾	Ion exchange chromatography purification ⁽¹⁹⁾	
	Diptera	AaeAPN1, AaeAPN2	Cry11Aa ⁽⁴⁾	Pull-down, heterologous expression, ligand blot ⁽⁴⁾
APN		Cry4Ba ⁽⁴⁾	2D SDS-PAGE, ligand blot ⁽⁴⁾	
APN2778, APN2783, APN5808		Cry4Ba ⁽²⁰⁾	<i>In silico</i> identification, RNA interference ⁽²⁰⁾	
ALP		Cry4Ba ⁽⁴⁾ , Cry11Aa ⁽⁷⁾	2D SDS-PAGE, ligand blot ⁽⁴⁾ , PLPC treatment, ligand blot ⁽⁷⁾	
<i>Anopheles albimanus</i>	α-amilase	Cry4Ba, Cry11Aa ⁽⁸⁾	PLPC treatment, ligand blot ⁽⁸⁾	
	APN	Cry11Aa ⁽¹⁾	Anion-exchange chromatography, enzymatic activity, SPR ⁽¹⁾	
	APN	Cry11Ba ⁽²⁴⁾	<i>In silico</i> identification, heterologous expression, PLPC treatment, anion- exchange chromatography ⁽²⁴⁾	
Coleoptera	<i>Anthonomus grandis</i>	ALP	Cry8Ka5 ⁽¹⁷⁾	2D-SDS-PAGE, ligand blot, mass spectrometry ⁽¹⁷⁾

(a) Compiled from: (1) Abdulah et. al., 2006; (2) Agrawal et. al., 2002; (3) Banks et. al., 2001; (4) Bayyareddy et. al., 2009; (5) Chen et. al., 2009; (6) Denolf et. al., 1997; (7) Fernández et. al., 2006; (8) Fernández-Luna et. al., 2010; (9) Garner et. al., 1999; (10) Gill et. al., 1995; (11) Jurat-Fuentes & Adang 2004; (12) Knight et. al., 1994; (13) Luo et. al., 1997; (14) Masson et. al., 1995; (15) McNall & Adang 2003; (16) Nakanishi et. al., 2002; (17) Nakasu et. al., 2010; (18) Rajagopal et. al., 2003; (19) Simpson & Newcomb 2000; (20) Saengwiman et. al., 2011; (21) Santosh & Singh P, 2011; (22) Valaitis et. al., 1997; (23) Yaoi et. al., 1997; (24) Zhang et. al., 2008.

Table 2. Description of GPI-anchored receptors founded in insects that bind to Cry toxins.

A GPI-anchored ALP that binds Cry toxins has been described in the lepidopterans *M. sexta*, *H. virescens* and *H. armigera*; in the dipteran *Ae. aegypti*, and in the coleopteran *Anthonomus grandis* (McNall et al., 2003; Jurat-Fuentes et al., 2004; Martins et al., 2010; Ning et al., 2010). In the case of *M. sexta*, ALP protein that bind Cry1A toxins was shown to be located in the microvilli of epithelial cells that is the site of action of Cry1A toxins (Chen et al., 2005). Also, an *H. virescens* laboratory selected population, YHD2, contained a retrotransposon insertion in the cadherin gene (Gahan et al., 2001). However, the mutation in the cadherin gene only accounted for 40-80% of the resistance phenotype. Additional mutations were responsible for the rest of the resistant phenotype in YHD2. These additional mutations were shown to affect GPI-ALP production, indicating that ALP is likely a functional receptor of Cry1Ac toxin in *H. virescens* (Jurat-Fuentes & Adang 2004).

Blocking the interaction of Cry toxins with GPI-anchored receptors has been useful in some cases to show the role of these proteins in Cry insecticidal activity. In the case of *M. sexta*, a scFv-phage that bound Cry1Ab toxin through β 16- β 22 of domain III blocked binding of Cry1Ab with APN but not with Bt-R1 and inhibited the toxicity of Cry1Ab in bioassays (Gomez et al., 2006). Nevertheless, in *B. mori* detached midgut cells, an anti-APN antibody did not affect toxicity of Cry1Aa in contrast to an anticadherin antibody that inhibited toxicity, suggesting either that this APN may not be involved in toxicity or that other additional GPI-anchored proteins or lipids could substitute APN function (Hara et al., 2003; Ibiza-Palacios et al., 2008). In *Ae. aegypti*, a peptide-phage that bound the 65 kDa ALP competed binding of the Cry11Aa to BBMV of mosquito and inhibited Cry11Aa toxicity in bioassays, suggesting that GPI-anchored ALP is a functional receptor of Cry11Aa (Fernandez et al., 2006).

Recently, ligand blot assays indicated that a 70 kDa GPI-anchored protein present in midgut brush border membrane vesicles of *A. albimanus* interacts with Cry4Ba and Cry11Aa toxins. This protein was identified as an α -amylase by mass spectrometry and enzymatic activity assays (Fernandez-Luna et al., 2010).

The fact that similar Cry binding proteins are involved in the mechanism of action of Cry toxins in both lepidopteran and dipteran insects suggests the Cry toxins have a conserved mode of action. However, the precise role of the Cry toxins receptors identified in mosquitoes in the mode of action of Cry toxins still remains to be determined. As in lepidopteran insects cadherin binding might facilitate oligomer formation while binding of Cry oligomer to GPI-anchored ALP or APN receptors might be necessary to facilitate membrane insertion. Nevertheless, the high binding affinity of Anopheline APN's to Cry11Ba is substantially different from what has been reported in lepidopteran insects and further studies on the differential role of APN and cadherin in monomer/oligomer binding in mosquitoes are necessary to determine the precise role of toxin binding to these receptor molecules.

3.3 Other insect molecules that bind Cry toxins identified using proteomic approaches

Proteomic approaches based on two-dimensional (2D) gel electrophoresis and mass spectrometry have been used to discover novel Bt toxin binding proteins and elucidate changes in midgut proteins associated with Bt resistance. Using this approach ALP was identified as a Cry1Ac binding protein in brush border of *Manduca sexta* and *Heliothis virescens* (McNall & Adang 2003; Krishnamoorthy et al., 2007). This identification was validated in *H. virescens* when ALP was demonstrated as a functional receptor molecule and

loss of the enzyme correlated with Bt resistance to Cry1Ac (Jurat-Fuentes & Adang 2004). Candas et al. used differential-in-gel electrophoretic (DIGE) analysis to compare Bt susceptible and resistant larvae of *Plodia interpunctella*. These authors detected increased levels of midgut enzymes associated with oxidative metabolism and altered migration of an F₁F₀-ATPase in resistant larvae when compared to susceptible proteins on 2D gels. Candas et al. also detected reduced levels of alkaline chymotrypsin in the resistant *P. interpunctella* larvae associated with reduced capacity for protoxin activation (Candas et al., 2003).

Additional Cry1Ac binding proteins in lepidopteran brush border preparations detected by 2DE ligand blots approach includes actin, aminopeptidase, vacuolar-ATPase subunit A and a desmocollin-like protein (McNall & Adang 2003; Krishnamoorthy et al., 2007). A proteomics-based approach using differential-in-gel electrophoretic (DIGE) analysis quantified altered levels of specific proteins in Bt susceptible and resistant larvae of *Plodia interpunctella* (Candas et al., 2003). Those authors detected changes in the levels of APN, V-ATPase and an F₁F₀-ATPase in resistant larvae.

The analysis of Cry4Ba binding proteins by mass spectrometry in *Ae. aegypti* BBMV, revealed two lipid rafts associated proteins, flotillin and prohibitin, as well as cytoplasmic actin, besides ALP and APN, thus suggesting that additional proteins as well as intracellular proteins may have an active role in the mode of action of Cry toxins in mosquitoes (Bayyareddy et al., 2009).

Protein	Insect	Reference
ABC transporter	<i>Heliothis virescens</i> (Lepidoptera)	Gahan et al., 2010
	<i>Helicoverpa armigera</i> (Lepidoptera)	Chen et al., 2010
V-ATPase	<i>Heliothis virescens</i> (Lepidoptera) (A subunit)	Krishnamoorthy et al., 2007
	<i>Anthonomus grandis</i> (Coleoptera) (A subunit)	Nakasu, 2010
	<i>Helicoverpa armigera</i> (Lepidoptera) (B subunit)	Chen et al., 2010
	<i>Aedes aegypti</i> (Diptera) (E subunit)	Bayyareddy et al., 2009
Heat Shock Proteins	<i>Helicoverpa armigera</i> (Lepidoptera)	Chen et al., 2010
	<i>Anthonomus grandis</i> (Coleoptera)	Nakasu, 2010
Actin	<i>Manduca sexta</i> (Lepidoptera)	McNall et al., 2003
	<i>Heliothis virescens</i> (Lepidoptera)	Krishnamoorthy, et al., 2007
	<i>Helicoverpa armigera</i> (Lepidoptera)	Chen et al., 2010
	<i>Aedes aegypti</i> (Diptera)	Bayyareddy et al., 2009
ATP sintase	<i>Aedes aegypti</i> (Diptera)	Bayyareddy, et al., 2009
Flotilin	<i>Aedes aegypti</i> (Diptera)	Bayyareddy et al., 2009
Prohibitin	<i>Aedes aegypti</i> (Diptera)	Bayyareddy et al., 2009

Table 3. Receptors of Cry toxins described in different insects using proteomic analysis.

3.4 How these receptors are involved in resistance to Cry toxins

Resistance to Cry toxins can be developed by mutations in the insect pests that affect any of the steps of the mode of action of Cry toxins. The most common mechanism of toxin resistance in insect pests until now is the reduction in toxin binding to midgut cells, that in different insect species include mutations in Cry toxin receptors (Gahan et al., 2001; Ferre & Van Rie 2002; Morin, Biggs et al. 2003; Zhang, Hua et al. 2008). In fact, the most frequently phenotype of insect resistance, denoted as “Mode 1 of Resistance”, is characterized by the reduction of one Cry1A toxin binding, cross resistance of Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac and lack of resistance to Cry1C. In several lepidopteran insects, the mode 1 of resistance is linked to mutations in the cadherin gene (Gahan et al., 2001; Morin et al., 2003; Xu et al., 2005). In field conditions three lepidopteran insect pests have evolved resistance to formulated Bt products, *Plodia interpunctella*, *Plutella xylostella* and *T. ni* [McGaughey, 1985; Tabashnik, et al, 1994; (Janmaat & Myers, 2003). In recent years, at least four cases of resistance to Bt crops have been documented, *H. zea* to Bt-cotton expressing Cry1Ac in United States, *S. frugiperda* to Bt-corn expressing Cry1F in Puerto Rico, *Busseola fusca* to Bt-corn expressing Cry1Ab in South Africa and *P. gossypiella* to Bt-cotton expressing Cry1Ac in India (Gill et al., 2011).

Recently, a resistant allele of a *H. virescens* resistant population was identified as a mutation in a gene coding for an ABC transporter molecule. This mutation affected binding of Cry1A toxin to brush border membrane vesicles indicating that this ABC transporter molecule is a novel Cry1A toxin receptor probably involved in the later stages of oligomer membrane insertion (Gahan et al., 2010). Also it was reported the correlation between reduced ALP protein, activity, and mALP expression levels in strains of three species in the Noctuidae Family with diverse resistance phenotypes against Cry toxins (*Heliothis virescens*, *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera frugiperda*) (Jurat-Fuentes et al., 2011). Finally, in a recent work it was showed the role of aminopeptidase the resistance to the Bt toxin Cry1Ac in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, evolved in greenhouses, is associated with differential alteration of two midgut aminopeptidases N, APN1 and APN6, conferred by a trans-regulatory mechanism (Tiewisiri & Wang, 2011).

4. Conclusion

The mode of action of Cry toxins is a multi-step process that involves the interaction with several receptor molecules leading to membrane insertion and cells lysis. The characterization of the mode of action of Cry toxins in susceptible organisms will be important to fully understand the mode of action of this family of proteins. In the case of GPI-anchored receptors, APN and ALP have been identified in different insect species as Cry toxin binding molecules and in several insects they have been shown to be important for toxin action. In the case of *M. sexta*, both APN and ALP have been shown to have a similar role since Cry1Ab toxin show similar binding affinities to both molecules depending on the oligomer state of the toxin. Thus it seems that APN and ALP have redundant roles in the action of Cry toxins. Nevertheless, it was shown that ALP could have a predominant role in toxicity since it was preferentially express in young instar larvae that are more sensitive to the toxin in contrast to APN that was expressed later in larval development. Nevertheless, it could still be possible that in certain insect species both APN and ALP act as a complex receptor or that APN or ALP could be differentially important in toxicity depending in the insect species.

5. Acknowledgments

This research was supported by CONACyT 83135 and PAPIIT/UNAM IN209011-3.

IG wants to special thankful to L'ORÉAL-UNESCO-AMC fellowship to support this work.

6. References

- Abdullah, M. A., A. P. Valaitis, et al. (2006). "Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*." *BMC Biochem* 7: 16.
- Atsumi, S., E. Mizuno, et al. (2005). "Location of the *Bombyx mori* aminopeptidase N type 1 binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin." *Appl Environ Microbiol* 71(7): 3966-77.
- Bayyareddy, K., T. M. Andacht, et al. (2009). "Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae." *Insect Biochem Mol Biol* 39(4): 279-86.
- Bel, Y. and B. Escriche (2006). "Common genomic structure for the Lepidoptera cadherin-like genes." *Gene* 381: 71-80.
- Boonserm, P., P. Davis, et al. (2005). "Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications." *J Mol Biol* 348(2): 363-82.
- Boonserm, P., M. Mo, et al. (2006). "Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution." *J Bacteriol* 188(9): 3391-401.
- Bravo, A., S. S. Gill, et al. (2007). "Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control." *Toxicon* 49(4): 423-35.
- Bravo, A., I. Gomez, et al. (2004). "Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains." *Biochim Biophys Acta* 1667(1): 38-46.
- Burton, S. L., D. J. Ellar, et al. (1999). "N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin." *J Mol Biol* 287(5): 1011-22.
- Candas, M., O. Loseva, et al. (2003). "Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: alterations in the indianmeal moth larval gut proteome." *Mol Cell Proteomics* 2(1): 19-28.
- Chen, J., K. G. Aimanova, et al. (2009). "*Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*." *Biochem J* 424(2): 191-200.
- Chen, J., K. G. Aimanova, et al. (2009). "Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin." *Insect Biochem Mol Biol* 39(10): 688-96.
- Chen, J., M. R. Brown, et al. (2005). "Comparison of the localization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A delta-endotoxins and their binding proteins in larval midgut of tobacco hornworm, *Manduca sexta*." *Cell Tissue Res* 321(1): 123-9.
- de Maagd, R. A., P. L. Bakker, et al. (1999). "Domain III of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac is involved in binding to *Manduca sexta* brush border membranes and to its purified aminopeptidase N." *Mol Microbiol* 31(2): 463-71.

- de Maagd, R. A., A. Bravo, et al. (2003). "Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria." *Annu Rev Genet* 37: 409-33.
- de Maagd, R. A., A. Bravo, et al. (2001). "How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world." *Trends Genet* 17(4): 193-9.
- Eguchi, M. (1995). "Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 111(2): 151-62.
- Eguchi, M., M. Azuma, et al. (1990). "Genetically defined membrane-bound and soluble alkaline phosphatases of the silkworm: their discrete localization and properties." *Prog Clin Biol Res* 344: 267-87.
- Fabrick, J., C. Oppert, et al. (2009). "A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin." *J Biol Chem* 284(27): 18401-10.
- Fernandez, L. E., K. G. Aimanova, et al. (2006). "A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae." *Biochem J* 394(Pt 1): 77-84.
- Ferre, J. and J. Van Rie (2002). "Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*." *Annu Rev Entomol* 47: 501-33.
- Flores, H., X. Soberon, et al. (1997). "Isolated domain II and III from the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin binds to lepidopteran midgut membranes." *FEBS Lett* 414(2): 313-8.
- Gahan, L. J., F. Gould, et al. (2001). "Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*." *Science* 293(5531): 857-60.
- Gahan, L. J., Y. Pauchet, et al. (2010). "An ABC Transporter Mutation Is Correlated with Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Toxin." *Plos Genetics* 6(12).
- Galitsky, N., V. Cody, et al. (2001). "Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57(Pt 8): 1101-9.
- Gill, M. and D. Ellar (2002). "Transgenic *Drosophila* reveals a functional *in vivo* receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1." *Insect Mol Biol* 11(6): 619-25.
- Gill, S. S., S. Likitvivanavong, et al. (2011). "Multiple Receptors as Targets of Cry Toxins in Mosquitoes." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(7): 2829-2838.
- Gomez, I., I. Arenas, et al. (2006). "Specific epitopes of domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*." *J Biol Chem* 281(45): 34032-9.
- Gomez, I., I. Arenas, et al. (2010). "Role of Alkaline Phosphatase from *Manduca sexta* in the Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin." *Journal of Biological Chemistry* 285(17): 12497-12503.
- Gomez, I., L. Pardo-Lopez, et al. (2007). "Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*." *Peptides* 28(1): 169-73.
- Gomez, I., J. Sanchez, et al. (2002). "Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin." *FEBS Lett* 513(2-3): 242-6.
- Gonzalez-Cabrera, J., B. Escriche, et al. (2003). "Binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in resistant and susceptible strains of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*)." *Insect Biochem Mol Biol* 33(9): 929-35.
- Griffitts, J. S., S. M. Haslam, et al. (2005). "Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin." *Science* 307(5711): 922-5.

- Grochulski, P., L. Masson, et al. (1995). "*Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation." *J Mol Biol* 254(3): 447-64.
- Guo, S., S. Ye, et al. (2009). "Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*." *J Struct Biol* 168(2): 259-66.
- Hara, H., S. Atsumi, et al. (2003). "A cadherin-like protein functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa and Cry1Ac toxins on midgut epithelial cells of *Bombyx mori* larvae." *FEBS Lett* 538(1-3): 29-34.
- Herrero, S., T. Gechev, et al. (2005). "*Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes." *BMC Genomics* 6: 96.
- Hua, G., R. Zhang, et al. (2008). "*Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity." *Biochemistry* 47(18): 5101-10.
- Ibiza-Palacios, M. S., J. Ferre, et al. (2008). "Selective inhibition of binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to cadherin-like and aminopeptidase proteins in brush-border membranes and dissociated epithelial cells from *Bombyx mori*." *Biochem J* 409(1): 215-21.
- Itoh, M., S. Takeda, et al. (1991). "Cloning and sequence analysis of membrane-bound alkaline phosphatase cDNA of the silkworm, *Bombyx mori*." *Biochim Biophys Acta* 1129(1): 135-8.
- Jenkins, J. L., M. K. Lee, et al. (2000). "Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor." *J Biol Chem* 275(19): 14423-31.
- Jurat-Fuentes, J. L. and M. J. Adang (2004). "Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae." *Eur J Biochem* 271(15): 3127-35.
- Krishnamoorthy, M., J. L. Jurat-Fuentes, et al. (2007). "Identification of novel Cry1Ac binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses." *Insect Biochem Mol Biol* 37(3): 189-201.
- Li, J., D. J. Derbyshire, et al. (2001). "Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms." *Biochem Soc Trans* 29(Pt 4): 571-7.
- Lorence, A., A. Darszon, et al. (1997). "Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes." *FEBS Lett* 414(2): 303-7.
- McNall, R. J. and M. J. Adang (2003). "Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis." *Insect Biochem Mol Biol* 33(10): 999-1010.
- Miranda-Rios, J., M. T. Fernandez-Luna, et al. (2010). "An alpha-amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae)." *Environmental Microbiology* 12(3): 746-757.
- Morin, S., R. W. Biggs, et al. (2003). "Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(9): 5004-9.
- Morse, R. J., T. Yamamoto, et al. (2001). "Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope." *Structure* 9(5): 409-17.

- Nakanishi, K., K. Yaoi, et al. (2002). "Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella* -- their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin." *FEBS Lett* 519(1-3): 215-20.
- Nosjean, O., A. Briolay, et al. (1997). "Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions." *Biochim Biophys Acta* 1331(2): 153-86.
- Ochoa-Campuzano, C., M. D. Real, et al. (2007). "An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor." *Biochem Biophys Res Commun.* 362(2):437-42.
- Pacheco, S., I. Gomez, et al. (2009). "Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a "ping pong" binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors." *J Biol Chem* 284(47): 32750-7.
- Pandian, G. N., T. Ishikawa, et al. (2008). "*Bombyx mori* midgut membrane protein P252, which binds to *Bacillus thuringiensis* Cry1A, is a chlorophyllide-binding protein, and the resulting complex has antimicrobial activity." *Appl Environ Microbiol* 74(5): 1324-31.
- Pardo-Lopez, L., I. Gomez, et al. (2006). "Structural changes of the Cry1Ac oligomeric prepore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion." *Biochemistry* 45(34): 10329-36.
- Park, Y., M. A. Abdullah, et al. (2009). "Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa and Cry3Bb toxicities to coleopteran larvae by a toxin-binding fragment of an insect cadherin." *Appl Environ Microbiol* 75(10): 3086-92.
- Pigott, C. R. and D. J. Ellar (2007). "Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity." *Microbiol Mol Biol Rev* 71(2): 255-81.
- Rajagopal, R., S. Sivakumar, et al. (2002). "Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor." *J Biol Chem* 277(49): 46849-51.
- Rajamohan, F., M. K. Lee, et al. (1998). "*Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 60: 1-27.
- Schnepf, E., N. Crickmore, et al. (1998). "*Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins." *Microbiol Mol Biol Rev* 62(3): 775-806.
- Schwartz, J. L., Y. J. Lu, et al. (1997). "Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors." *FEBS Lett* 412(2): 270-6.
- Soberon, M., S. S. Gill, et al. (2009). "Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells?" *Cell Mol Life Sci* 66(8): 1337-49.
- Valaitis, A. P., J. L. Jenkins, et al. (2001). "Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity." *Arch Insect Biochem Physiol* 46(4): 186-200.
- Xu, X., L. Yu, et al. (2005). "Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*." *Appl Environ Microbiol* 71(2): 948-54.
- Zhang, R., G. Hua, et al. (2008). "A 106-kDa aminopeptidase is a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin in the mosquito *Anopheles gambiae*." *Biochemistry* 47(43): 11263-72.
- Zhuang, M., D. I. Oltean, et al. (2002). "*Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation." *J Biol Chem* 277(16): 13863-72.

Cadherin binding is not a limiting step for *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba toxicity to *Aedes aegypti* larvae

Claudia RODRÍGUEZ-ALMAZÁN*, Esmeralda Z. REYES*, Fernando ZÚÑIGA-NAVARRETE*, Carlos MUÑOZ-GARAY*, Isabel GÓMEZ*, Amy M. EVANS†, Supaporn LIKITVIVATANAVONG†, Alejandra BRAVO*, Sarjeet S. GILL† and Mario SOBERÓN*¹

*Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. postal 510-3, Cuernavaca 62250, Morelos, Mexico, and †Department of Cell Biology and Neuroscience, University of California Riverside, Riverside, CA 92506, U.S.A.

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* produces three Cry toxins (Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11Aa) that are active against *Aedes aegypti* larvae. The identification of the rate-limiting binding steps of Cry toxins that are used for insect control in the field, such as those of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, should provide targets for improving insecticides against important insect pests. Previous studies showed that Cry11Aa binds to cadherin receptor fragment CR7–11 (cadherin repeats 7–11) with high affinity. Binding to cadherin has been proposed to facilitate Cry toxin oligomer formation. In the present study, we show that Cry4Ba binds to CR7–11 with 9-fold lower binding affinity compared with Cry11Aa. Oligomerization assays showed that Cry4Ba is capable of forming oligomers when proteolytically

activated *in vitro* in the absence of the CR7–11 fragment in contrast with Cry11Aa that formed oligomers only in the presence of CR7–11. Pore-formation assays in planar lipid bilayers showed that Cry4Ba oligomers were proficient in opening ion channels. Finally, silencing the cadherin gene by dsRNA (double-stranded RNA) showed that silenced larvae were more tolerant to Cry11Aa in contrast with Cry4Ba, which showed similar toxic levels to those of control larvae. These findings show that cadherin binding is not a limiting step for Cry4Ba toxicity to *A. aegypti* larvae.

Key words: *Aedes aegypti*, *Bacillus thuringiensis*, cadherin, Cry toxin, pore-forming toxin, receptor binding.

INTRODUCTION

Bacillus thuringiensis pore-forming toxins are valuable tools for the control of insect pests in agriculture and also against mosquitoes that are vectors of human diseases [1]. For the control of mosquitoes, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* has been used worldwide for the control of *Aedes aegypti*, and certain *Culex* and *Anopheles* species that are vectors of important diseases such as dengue fever and malaria [2]. Upon sporulation, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* produces crystal inclusions that are formed by at least three structurally related Cry toxins (Cry11Aa, Cry4Aa and Cry4Ba) and a non-related Cyt toxin (Cyt1Aa).

The three *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry toxins belong to a family of 3d (three-domain)-Cry toxins that have members that are active against insect larvae from different insect orders such as Lepidoptera, Coleoptera and Diptera. The 3d-Cry toxins have three discrete structural domains. Domain I is a seven α -helix bundle implicated in membrane insertion, toxin oligomerization and pore formation. Domain II is a β -prism of three antiparallel β -sheets packed around a hydrophobic core with exposed loop regions involved in recognition of insect midgut proteins, and domain III is a β -sandwich of two antiparallel β -sheets also involved in midgut protein recognition. Since domains II and III are implicated in binding to larvae insect gut proteins, they largely mediate insect specificity [1].

Cry toxins are widely believed to exert their toxicity by forming pores in the epithelia of insect midgut cells bursting them by osmotic lysis. To do so, Cry toxins rely on binding to specific proteins present in the surface of epithelium midgut cells of the

target insects. The identification of the rate-limiting binding steps of Cry toxins that are used for insect control in the field should provide targets for improving insecticides against important insect pests, identifying resistant gene alleles and succeeding in insect-resistant-managing strategies. In lepidopteran insects, the Cry1A toxin-binding proteins identified include cadherin proteins, GPI (glycosylphosphatidylinositol)-anchored APNs (aminopeptidases N) and GPI-anchored ALPs (alkaline phosphatases) [1,3]. In order to insert into the cell membrane, Cry1A toxins undergo a sequential binding interaction with the receptors mentioned above [4,5]. First Cry1A crystal inclusions are solubilized due to high pH present in the larval midgut lumen and the 130 kDa Cry1A protoxins are then proteolytically activated by larval midgut proteases, yielding 60 kDa monomers that have the three-dimensional structure described above. Cry1A monomers bind to highly abundant APN and ALP molecules by domain II and domain III residues. The binding affinity of the Cry1A monomer with GPI proteins is in the 100–200 nM range [5]. Binding to GPI-anchored proteins is believed to concentrate the Cry1A toxin in the apical surface of insect midgut cells, where Cry1A then binds with high affinity to cadherin (K_d of 1 nM) through exposed loops of domain II [6,7]. Insect cadherins that bind Cry toxins are composed of three domains: an ectodomain formed by 11–12 CRs (cadherin repeats), a transmembrane domain and an intracellular domain [8]. The binding interaction with cadherin facilitates further processing of the Cry1A toxin by an unidentified protease clipping out helix α -1, facilitating the formation of toxin oligomers of 250 kDa [9]. The Cry1A oligomers bind again to APN and ALP with high affinity (K_d of 0.6–1 nM) through domain

Abbreviations used: 3d, three-domain; ALP, alkaline phosphatase; APN, aminopeptidase N; CR, cadherin repeat; dsRNA, double-stranded RNA; GPI, glycosylphosphatidylinositol; PC, phosphatidylcholine; PLB, planar lipid bilayer; qPCR, quantitative PCR; RNAi, RNA interference; SPR, surface plasmon resonance; SUV, small unilamellar vesicle.

¹ To whom correspondence should be addressed (email mario@ibt.unam.mx).

II residues [4,5,10]. Binding to APN or ALP has been proposed to facilitate the insertion of the pre-pore oligomer into the insect membrane, forming pores that burst the insect midgut cells [11].

In the case of the dipteran *A. aegypti*, similar Cry toxin-binding midgut proteins have been identified such as cadherin, APN and ALP [12–15], suggesting that the mode of action of Cry toxins in mosquitoes is conserved [12]. Regarding the *A. aegypti* cadherin, it was shown that Cry11Aa binds with high affinity (K_d of 16.7 nM) to a fragment containing the membrane-proximal part of the ectodomain of this receptor molecule (CR7–11) [13]. Binding competition experiments showed that Cry4Ba and Cry11Ba, produced by *B. thuringiensis* subsp. *jegathesen*, competed with Cry11Aa for binding to this cadherin fragment showing that these toxins share the same cadherin-binding sites. In contrast, Cry4Ba did not compete with Cry11Aa for binding to CR7–11, indicating that Cry4Ba may not rely on binding to cadherin for toxicity [13].

In the present study, we characterized the binding of Cry4Ba to *A. aegypti* CR7–11. Our data show that Cry4Ba binds this cadherin fragment with at least 9-fold lower affinity in comparison with the binding affinity of Cry11Aa for this fragment. We show that oligomerization of Cry11Aa depends on its interaction with cadherin. In contrast, Cry4Ba readily forms oligomers *in vitro* after activation with proteases in the absence of the cadherin protein. The Cry4Ba oligomers produced stable ion channels with high probability of being open in black lipid bilayers indicating their functionality. Finally, our results suggest that Cry4Ba is a Cry toxin that does not require cadherin binding to induce toxicity in *A. aegypti* larvae, since cadherin-silenced larvae are not more tolerant to Cry4Ba toxin in contrast with Cry11Aa where cadherin-silenced larvae became more tolerant to this toxin. Although cadherin binding has been shown to be an important binding step of different Cry toxins, the results of the present study show that it is not a limiting step in the toxicity of Cry4Ba to *A. aegypti*.

EXPERIMENTAL

Growth of *B. thuringiensis* strains and production of Cry4Ba and Cry11Aa crystal inclusions

For the production of Cry4Ba and Cry11Aa crystals, acrySTALLIFEROUS *B. thuringiensis* strains containing plasmids pHT618 [16] or pGC6 [17] respectively were cultured for 3 days at 29°C and 200 rev./min in nutrient broth sporulation medium supplemented with erythromycin (10 µg/ml). Spores and inclusion bodies produced by the *B. thuringiensis* strains were harvested and washed three times with 0.3 M NaCl and 0.01 M EDTA, pH 8.0.

Expression of CR7–11

The *Escherichia coli* M15 (pREP4) strain containing the expression plasmid pQE30G10 (cloned in pQE30 series vector, Qiagen) for CR7–11 has been described previously [13]. For protein expression, the gene construct was induced by addition of 1 mM IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside) and protein was produced as inclusion bodies. Inclusion bodies were solubilized in 8 M urea. The N-terminally His₆-tagged recombinant protein was purified using Ni-NTA (Ni²⁺-nitrilotriacetate) resin (Qiagen) under denaturing conditions and resolved by SDS/PAGE (10% gels). The CR7–11 protein was dialysed against PBS.

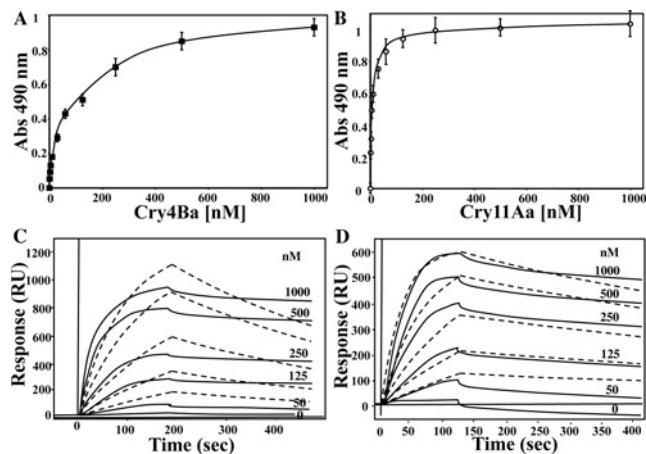


Figure 1 Cry4Ba binds with lower affinity than Cry11Aa to *A. aegypti* CR7–11

Cry4Ba (A) or Cry11Aa (B) binding to CR7–11 analysed by ELISA saturation binding assays. ELISA binding assays were performed by adding 2.5 µg of Cry4Ba or Cry11Aa to ELISA plates and then incubating with different concentrations of CR7–11 recombinant protein. Results are means ± S.D. of four repetitions. SPR binding analyses of Cry4Ba (C) or Cry11Aa (D) were performed by immobilizing Cry toxins using conventional amine coupling. Sensograms of serial doubling dilutions of CR7–11 are shown as continuous lines, whereas broken lines represent curves generated by a one-site binding model. RU, response units.

ELISA

ELISA 96-well plates (Costar) were incubated for 12 h at 4°C with 2.5 µg of Cry4Ba or Cry11Aa in 50 mM NaHCO₃ (pH 9.6), followed by five washes with PBS and 0.2% Tween 20. The plates were then incubated with PBS, 0.5% gelatin (Bio-Rad Laboratories) and 0.2% Tween 20 for 1 h at 37°C and washed five times with PBS and 0.1% Tween 20. The ELISA plates were incubated with different concentrations of CR7–11 for 2 h at 37°C and washed again with PBS and 0.2% Tween 20. The CR7–11 fragment that bound Cry4Ba was revealed with a 1:5000 dilution of horseradish-peroxidase-conjugated anti-His antibody (Qiagen) for 1 h and washed three times with PBS and 0.1% Tween 20. Finally, plates were incubated with 2 mM *o*-phenylenediamine and 0.7% H₂O₂ in 0.1 M sodium phosphate (pH 5). The enzymatic reaction was stopped with 6 M HCl and the absorbance was read at 490 nm with a microplate reader from Molecular Devices. The data presented are the result of four repetitions of each CR7–11 concentration shown in Figure 1.

Biosensor (SPR) analysis of Cry4Ba and Cry11Aa affinities to CR7–11

SPR (surface plasmon resonance) measurements were performed using a SensiQ instrument (ICx Nomadics). The running buffer for all experiments, HBS (Hepes-buffered saline) (pH 7.4), containing 10 mM Hepes, 150 mM NaCl and 0.005% Tween 20, was freshly prepared, filtered (pore size of 0.22 µm) and degassed. Cry4Ba and Cry11Aa toxins were immobilized on to a carboxy-functionalized sensorchip (ICx Nomadics) by conventional amine coupling at densities less than 1500 RU (response units). The flow cells were blocked with a 5 min injection of 1 M ethanolamine at a flow rate of 10 ml/min. The analyte (CR7–11) was injected at a flow rate of 25 ml/min. Serial doubling dilutions of CR7–11 were analysed, and the surface was regenerated with a 1 min injection of 20 mM NaOH. Triplicate injections of each toxin concentration were carried out. The data were analysed using the SensiQ Software Qdat

version B.02. This software employs non-linear regression and the Levenberg–Marquadt algorithm to fit experimental data to a binding interaction model that defines the interaction.

Preparation of SUVs (small unilamellar vesicles)

SUVs were prepared as described previously [18]. Briefly, egg-yolk PC (phosphatidylcholine) (Avanti Polar Lipids), cholesterol (Avanti Polar Lipids) and stearylamine (Sigma) from chloroform stocks, were mixed in glass vials in a 10:3:1 (by vol.) proportion at a final concentration of 2.6 mmol and dried by gentle argon flow evaporation followed by overnight storage under vacuum to remove residual chloroform. Lipids were then hydrated in 650 ml of 10 mM Ches [2-(*N*-cyclohexylamino)ethanesulfonic acid] (pH 9) and 150 mM KCl, or with 10 mM Hepes (pH 7) and 150 mM KCl by 30 min of incubation followed by vortex-mixing. The lipid sample was sonicated twice for 2 min in a Branson 1200 bath sonicator to prepare SUVs. SUVs were used within 2–3 days upon their preparation.

Oligomer-formation assays

For Cry11Aa, oligomer formation was performed as described previously [18]. For these assays, 2.5 μ g of soluble Cry11Aa protoxin was incubated in a 100 ml final volume with 250 mM SUVs and 2% (w/w) trypsin, in the presence or absence of 2.5 μ g of CR7–11 protein fragment. For Cry4Ba, a similar activation procedure was performed: 2.5 μ g of soluble Cry4Ba protoxin was activated under the same conditions, but with 10% (w/w) chymotrypsin. The mixture was incubated for 1 h at 37°C, and 1 mM PMSF was added to stop the reaction. The membrane fraction was separated by centrifugation at 90000 rev./min for 1 h at 4°C using a TLA-100 rotor (Beckman). The samples were analysed by SDS/PAGE (10% gels) and Western blotting using polyclonal anti-Cry11Aa or anti-Cry4Ba antibodies.

PLB (planar lipid bilayer) experiments

For pore-formation assays, membrane fractions containing Cry4Ba oligomer (starting with 2.5 μ g of soluble Cry4Ba protoxin for toxin activation as explained above) were suspended in 50 ml of buffer containing 5 mM Hepes (pH 7.4) and 10 mM KCl. PLBs were made by the Müeller and Rudin method as described previously [19], with egg-derived PC (20 mg/ml in *n*-decane). Typical bilayer capacitance values were between 250 and 350 pF. Buffer solution (5 mM Hepes, pH 7.4, and 300 mM KCl) was added to the *cis* compartment, whereas in the *trans* compartment, the buffer solution was modified to contain 10 mM KCl. The different KCl concentrations in the *cis* and *trans* compartments facilitate membrane vesicles fusion to the bilayer by adding 15 ml of the vesicle suspension containing Cry4Ba oligomer to the *cis* compartment, whereas that in the *trans* compartment was held at virtual ground. All experiments were performed at room temperature (25°C). Single channel currents were recorded with a Dagan 3900A patch-clamp amplifier. Currents were filtered at 200 or 500 Hz, digitized online at 1 or 2 kHz respectively and analysed on a personal computer using a Digidata 1200 interface and Axotape and pClamp software (Axon Instruments).

RNAi (RNA interference) assays

Two fragments for the 5'- and 3'-end of the cloned *A. aegypti* cadherin gene were obtained using the cloned cadherin gene as template. The 507 bp 5' fragment was obtained using 5'-AATACCGGAGCATGAGGATG-3' and 5'-

ACACCGTTCCTTGCCACTTTC-3' as the sense and antisense primers respectively, whereas the 3' 781 bp fragment was obtained using 5'-TGTGATAGTGGATCGGTTTGAG-3' and 5'-TTCTTCGTTTTTCGGTCAAATCT-3' as the sense and antisense primers respectively. As control dsRNA (double-stranded RNA), a *LacZ* fragment of 900 bp was amplified with appropriate primers. The fragments were cloned into pLitmus28i (HiScribe™, New England Biolabs) 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 products were purified with QIAquick PCR purification kit protocol (Qiagen). *In vitro* transcription of both DNA strands of the insert was performed with T7 RNA polymerase using the HiScribe™ RNAi transcription kit (New England Biolabs) following the manufacturer's instructions, yielding dsRNA.

RNAi experiments were performed as described previously [20]. A total of 200 neonate *A. aegypti* larvae in 10 ml of dechlorinated water were fed for 16 h with 200 μ g of dsRNA (1 μ g per larva) previously encapsulated with Effectene transfection reagent (Qiagen). For encapsulating the dsRNA with Effectene, 200 μ g of dsRNA in a final volume of 4 ml of DNA-condensation buffer (EC buffer, as indicated in the Effectene transfection reagent handbook) were mixed for 10 s by vortex agitation with 0.8 ml of Enhancer buffer and incubated for 5 min at room temperature. Then the sample was mixed with 1.3 ml of Effectene by vortex agitation (10 s) and incubated for 10 min at room temperature. This 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 on a regular diet until they reached fourth instar for bioassays or for gut dissection to be analysed by quantitative real-time PCR.

To quantify cadherin 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). To reduce genomic contamination, primers that flank a predicted exon–exon junction were used. qPCR (quantitative PCR) was performed on ABI 7700 (Applied Biosystems) using Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Qiagen). The fold changes between transcript levels in silenced and normal larvae was calculated by the comparative threshold cycle (C_T) method.

Insect bioassays

For synergistic toxicity assays, ten early fourth-instar *A. aegypti* larvae reared at 28°C and a 12 h light/12 h dark cycle were placed in 2 ml of dechlorinated water with a 10–15% lethal concentration of Cry11Aa or Cry4Ba (75 ng/ml for both toxins) and 10- or 25-fold higher concentration of CR7–11 as described previously ($n = 4$) [21]. The concentration of protein in the CR7–11 inclusion bodies was determined after SDS/PAGE of different quantities of CR7–11 and comparing with known BSA protein concentrations on the same gel as described in [21]. Mortality was analysed after 24 h.

For dsRNA-treated larvae, bioassays were performed using 20 larvae in 200 ml of dechlorinated water that contained individual toxin concentrations at the LC_{50} level (100 ng/ml for Cry4Ba and 250 ng/ml for Cry11Aa). Larval mortality was analysed after 24 h.

RESULTS

Binding of Cry4Ba and Cry11Aa to cadherin receptor

Previous work indicated that Cry4Ba did not compete with Cry11Aa for binding to CR7–11, suggesting that either Cry4Ba does not bind to this cadherin fragment or it binds with a much

Table 1 Binding kinetics of CR7–11 to Cry4Ba and Cry11Aa

k_{on} is the association rate constant; k_{off} is the dissociation rate constant; K_d is the apparent affinity (k_{off}/k_{on}).

Toxin	k_{on} ($\times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	k_{off} ($\times 10^3 \text{ s}^{-1}$)	K_d (nM)
Cry4Ba	0.132	2.034	154
Cry11Aa	1.470	2.521	17

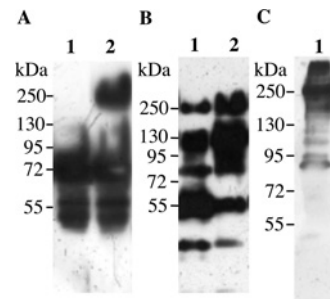
lower affinity than Cry11Aa [13]. The binding affinity of Cry11Aa to CR7–11 was determined previously by ELISA binding assays showing a K_d value of 16.7 nM [13]. To analyse the binding of Cry4Ba to CR7–11, a binding saturation curve of Cry4Ba to cadherin CR7–11 produced in *E. coli* was obtained from an ELISA binding assay. As control, we determined also the binding of Cry11Aa to CR7–11. Figure 1(A) shows that Cry4Ba binds to CR7–11 in a saturable way with lower binding affinity (K_d of 134.9 nM) than that of Cry11Aa (K_d of 14.8 nM). To determine the binding affinities in real time, the binding of Cry4Ba and Cry11Aa to CR7–11 was determined by SPR analyses showing that CR7–11 bound both immobilized Cry4Ba and Cry11Aa (Figure 1B and Table 1). The overall affinity for CR7–11 binding to Cry4Ba (K_d of 154 nM) or to Cry11Aa (K_d of 17 nM) was estimated from the k_{on} and k_{off} values obtained from the binding curve (Figure 1B and Table 1). These results show that Cry4Ba binds CR7–11 with 9-fold lower affinity than Cry11Aa.

Oligomer formation by Cry11Aa and Cry4Ba

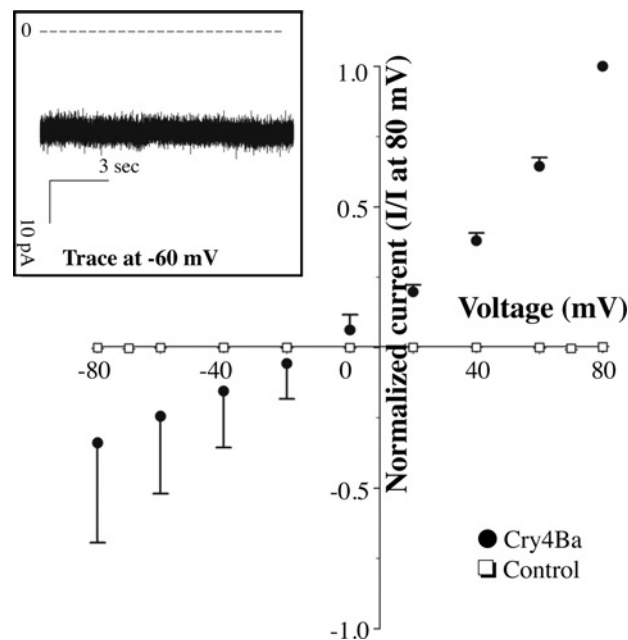
Previous work showed that Cry11Aa, when proteolytically activated in the presence of Cyt1Aa, was capable of forming oligomers *in vitro* that were proficient on pore-formation activity, suggesting that Cyt1Aa may function as a receptor of Cry11Aa, inducing oligomerization of the toxins such as cadherin receptors in lepidopteran insects [18]. However, oligomerization of Cry11Aa when activated in the presence of *A. aegypti* cadherin or CR7–11 fragment has not been analysed previously. Figure 2(A) shows that Cry11Aa forms oligomers of 250 kDa when activated by protease treatment in the presence of the CR7–11 fragment and lipid vesicles (lane 2). In contrast, Cry11Aa did not oligomerize in the absence of CR7–11 (Figure 2A, lane 1). We also analysed the formation of Cry4Ba oligomers performing a similar experiment in the presence or absence of CR7–11 and lipid vesicles. Figures 2(B) and 2(C) (lanes 1) show that Cry4Ba oligomers were formed even when activated in the absence of CR7–11.

Pore formation of Cry4Ba oligomers

To determine the functionality of Cry4Ba oligomers that were formed in the absence of CR7–11, their capacity to induce ion channel activity was determined in black lipid bilayers. Cry4Ba protoxin was activated by protease treatment in the presence of lipid vesicles, but in the absence of CR7–11 peptide. Lipid vesicles containing Cry4Ba oligomers were recovered by centrifugation and the presence of Cry4Ba oligomer in the lipid vesicles was revealed by Western blot analysis (Figure 2C). The Cry4Ba-containing vesicles were then fused to a lipid bilayer, and ion channel activity was recorded as described in the Experimental section. Figure 3 shows that the Cry4Ba oligomer response involved the formation of ion channels with high open probability as described previously for Cry1Ab oligomers [19].

**Figure 2** *In vitro* oligomer formation of Cry11Aa and Cry4Ba

Cry11Aa (A) or Cry4Ba (B and C) were activated by protease treatment with or without CR7–11, and oligomer formation was revealed by Western blotting with anti-Cry11Aa or anti-Cry4Ba polyclonal antibodies. (A) Proteolytic activation of Cry11Aa without (lane 1) or with (lane 2) CR7–11 in the assay. (B) Proteolytic activation of Cry4Ba without (lane 1) or with (lane 2) CR7–11 in the assay. (C) Cry4Ba oligomer association with membrane vesicles after recovering the membrane pellet by centrifugation (lane 1). Molecular masses are indicated in kDa.

**Figure 3** Cry4Ba oligomers induce ionic channels with high open probability in black lipid bilayers

Current–voltage (I – V) relationship of the macroscopic currents induced by the oligomeric Cry4Ba toxin measured under asymmetrical 300 mM *cis* and 10 nM *trans* KCl conditions. The inset shows a representative trace of the currents induced by Cry4Ba oligomer.

Toxicity of Cry4Ba and Cry11Aa in the presence of CR7–11

Previous work has shown that cadherin fragments containing Cry-binding sites are able to enhance toxicity of Cry toxins in different insect orders [21–23]. In lepidopteran insects, this synergistic effect correlated with enhanced oligomer formation [24]. To determine the effect of *A. aegypti* CR7–11 on the toxicity of Cry4Ba and Cry11Aa toxins, toxicity assays were performed with a 10% lethal concentration of each toxin (75 ng/ml) in the presence of CR7–11 fragment as described in the Experimental section. Figure 4 shows that Cry11Aa toxicity was enhanced 2.7-fold in the presence of a 10-fold excess of CR7–11. In contrast, there was no change in Cry4Ba toxicity with the same molar excess of CR7–11. However, a 25-fold excess of CR7–11

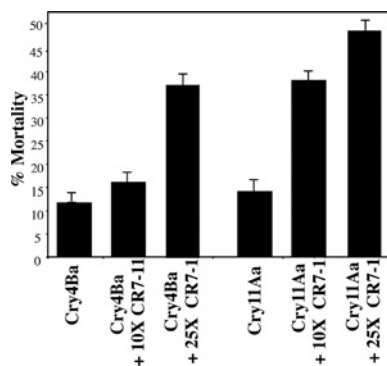


Figure 4 Effect of CR7–11 on Cry4Ba and Cry11Aa toxicity

Ten fourth-instar larvae were exposed to 75 ng/ml Cry11Aa or Cry4Ba with or without a 10- or 25-fold higher concentration of CR7–11. Results are means \pm S.D. of three repetitions.

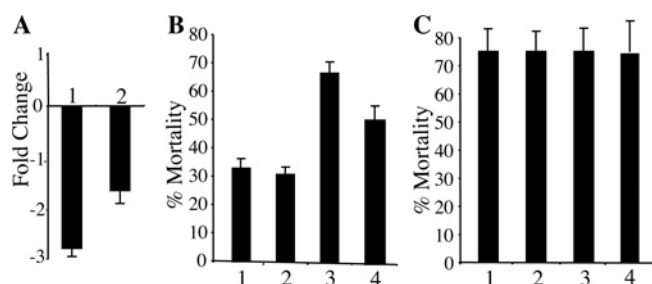


Figure 5 Silencing of *A. aegypti* cadherin gene and its effect on toxicity of Cry11Aa and Cry4Ba

(A) Cadherin transcript levels determined by qPCR of silenced larvae with the cadherin dsRNA of 781 (1) or 587 bp (2) compared with non-silenced larvae. (B) Percentage of Cry11Aa mortality (250 ng/ml) of silenced larvae using cadherin dsRNA of 781 bp (1) or 587 bp (2) compared with non-silenced larvae (3) and with a control of silenced larvae with *LacZ* dsRNA (4) ($n = 6$). (C) Percentage of mortality of silenced larvae with cadherin dsRNA of 781 bp (1) or 587 bp (2) compared with non-silenced larvae (3) and to a control of silenced larvae with *LacZ* dsRNA (4) treated with Cry4Ba (100 ng/ml). Results are means \pm S.D. of six repetitions.

enhanced 3.5-fold Cry11Aa toxicity, whereas a 2.5-fold increased Cry4Ba toxicity was observed under these conditions (Figure 4).

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

In order to determine whether cadherin binding is a limiting step in the toxicity of Cry11Aa and Cry4Ba, we decided to test the toxicity of Cry11Aa and Cry4Ba to *A. aegypti* larvae that were silenced for the cadherin transcript by feeding with cadherin dsRNA. Previous work showed efficient gene silencing in *A. aegypti* larvae by feeding with dsRNA molecules encapsulated in Effectene liposomes [20]. Two dsRNA molecules from the cadherin gene of 507 and 781 bp were produced by *in vitro* transcription using T7 polymerase as described in the Experimental section. These dsRNA molecules were encapsulated using Effectene and then used to feed neonate larvae. Transcript levels of cadherin RNA were analysed by qPCR in silenced fourth-instar larvae. Figure 5(A) shows that both fragments reduced the cadherin transcript 2–3-fold in comparison with non-silenced larvae. Silenced larvae were exposed to either Cry4Ba or Cry11Aa at non-saturated concentrations (100 and 250 ng/ml respectively) that showed a 70% mortality to determine the effect of reduced cadherin transcript on the toxicity of these Cry toxins. Figure 5(B) shows that silenced larvae (lanes 1 and 2) become more tolerant to Cry11Aa (30% mortality) in

contrast with Cry4Ba that showed the same toxic levels to silenced or control larvae (Figure 5C). As a control, a dsRNA of *LacZ* gene fragment was used to feed *A. aegypti* larvae and toxicity to Cry11Aa or Cry4Ba was analysed under the same conditions, showing a minor effect on toxicity of Cry11Aa and no effect on toxicity of Cry4Ba (Figures 5B and 5C, bars 4).

DISCUSSION

The mode of action of three 3d-Cry toxins seems to be conserved in different insect orders. Cry toxin-binding cadherin proteins have been described in lepidopteran, dipteran and coleopteran insects [3]. It has been shown that binding to cadherin facilitates oligomer formation of Cry1A and Cry3A toxins, active against lepidopteran and coleopteran larvae respectively, when activated *in vitro* by protease treatment [9,25]. In the present study, we show that binding to *A. aegypti* (dipteran) cadherin fragment facilitates the formation of Cry11Aa oligomers after protease treatment, indicating that cadherin binding fulfils the same role in the three different insect orders, i.e. to facilitate additional proteolytic removal of helix α -1 resulting in the formation of a pre-pore oligomer that is responsible for toxin membrane insertion and pore formation. Nevertheless, the results of the present study indicate that Cry4Ba has 9-fold lower binding affinity to *A. aegypti* cadherin fragment compared with Cry11Aa explaining previous observations that Cry4Ba was not able to compete with Cry11Aa for binding to CR7–11 [13]. It is important to point out that Cry4Ba is slightly more toxic ($LC_{50} = 100$ ng/ml) than Cry11Aa ($LC_{50} = 250$ ng/ml), regardless of the lower affinity of Cry4Ba to the *A. aegypti* cadherin. This result suggests that Cry4Ba does not rely on binding to cadherin for *A. aegypti* toxicity either because it relies on binding to another as yet unidentified midgut molecule for oligomer formation or because it can form functional oligomers just by protease activation. In the lepidopteran *Lymantria dispar*, Cry1Ac toxin does not bind to cadherin, but instead relies on the binding to a different midgut protein, an anionic glycoconjugate (BTR270) [26].

In the present study, we have shown that Cry4Ba is capable of forming oligomers that are proficient in pore-formation activity when proteolytically activated *in vitro* in the absence of the cadherin protein in contrast with Cry11Aa that formed oligomers only when treated with proteases in the presence of CR7–11 fragment. Thus this result suggests that Cry4Ba does not rely on another receptor for oligomer formation since it can form oligomers *in vitro* without receptor interaction. Previous work showed that Cry4Ba is capable of forming oligomers *in vitro* [27]. Additionally, when the three-dimensional crystal structure of Cry4Ba was solved, it revealed that the Cry4Ba domain I helices α 1– α 2b were absent owing to proteolysis during the crystallization process, resulting in the formation of a crystal structure composed of three monomers that make inter-monomer contacts through domain I helices α -3, α -4 and α -6 [28]. The Cry4Ba oligomer structure was later proposed to represent the pre-pore oligomer and was used to model the structure of the related Cry4Aa when inserted into the membrane [29]. These results suggest that Cry4Ba, in contrast with Cry11Aa, is capable of forming the pre-pore oligomer without the need for cadherin or other midgut molecule interactions.

The mechanism of action of Cry toxins also involves other protein receptors such as GPI-anchored receptors (APN or ALP) [1]. The principal role of GPI-anchored receptors is to bind the pre-pore oligomer and to facilitate its insertion into the membrane [11]. It was reported recently that expression of an *A. aegypti* GPI-anchored ALP isoform (mALP) in Sf9 insect cells resulted in Cry4Ba binding to the transfected cells inducing susceptibility to

this toxin [30]. These results support those of the present study that Cry4Ba does not rely on cadherin binding to exert its toxic effect, since expression of mALP alone, which would bind the Cry4Ba pre-pore, was sufficient to confer Sf9 susceptibility to the toxin [29]. It is important to mention that other GPI-anchored Cry1A-binding molecules such as APNs from different insects have been expressed in insect cell lines but failed to confer susceptibility to Cry1A toxins (reviewed in [3]), probably due to the fact that Cry1A toxins do not form oligomers in the absence of cadherin interaction [11].

In the three insect orders considered, cadherin fragments containing Cry toxin-binding sites enhance the toxicity of the corresponding Cry protein and, in the case of Cry1Ab, this enhanced toxicity correlated with enhanced oligomer formation [21–24]. To gain *in vivo* evidence that Cry4Ba does not rely on cadherin binding to exert its toxicity to *A. aegypti* larvae, toxicity assays of Cry11Aa and Cry4Ba were performed in the presence of CR7–11. Our results show that CR7–11 enhanced Cry11Aa toxicity more efficiently than the toxicity of Cry4Ba, since lower amounts of CR7–11 were sufficient to observe enhanced Cry11Aa toxicity in contrast with Cry4Ba that required higher amounts of CR7–11 to observe an effect on its toxicity (Figure 4). These results could be explained by the differences in binding affinities of Cry11Aa and Cry4Ba to CR7–11. A previous study showed that a similar protein fragment containing CR9–11 from *Anopheles gambiae* cadherin enhanced Cry4Ba toxicity to both *A. gambiae* and *A. aegypti* [21]. Interestingly, the *A. gambiae* cadherin fragment was shown to bind Cry4Ba with high affinity (K_d of 13 nM) in contrast with at least 11-fold lower binding affinity of Cry4Ba to the *A. aegypti* CR7–11 (K_d of 154 nM). Overall, these results might suggest that Cry4Ba is capable of forming the pre-pore oligomer in the absence of cadherin binding, but a high-affinity binding site (such as *A. gambiae* CR9–11) could still enhance Cry4Ba oligomer formation and toxicity. This remains to be determined.

Although cadherin binding has been shown to be an important binding step of different Cry toxins, the results of the present study show that it is not a limiting step in the toxicity of Cry4Ba to *A. aegypti*, since cadherin-silenced larvae were as sensitive to Cry4Ba as control larvae in contrast with Cry11Aa that showed reduced toxicity to cadherin-silenced larvae. Identifying the rate-limiting binding steps of Cry toxins that are used for insect control in the field should provide targets for improving insecticides against important insect pests, identifying resistant gene alleles and succeeding in insect-resistant-managing strategies.

AUTHOR CONTRIBUTION

Claudia Rodríguez-Almazán performed experiments (ELISA binding assays of Cry11Aa and Cry4Ba to CR7–11, final oligomerization assays of Cry11Aa and Cry4Ba, the synergism of CR7–11 on Cry11Aa and Cry4Ba toxicity). Esmeralda Reyes performed experiments (initial binding assays of Cry toxins to Cry4Ba, initial oligomerization assays of Cry4Ba, prepared Cry4Ba membrane oligomer in lipid vesicles for pore-formation assays). Fernando Zuñiga-Navarrete performed experiments (SPR binding assays of Cry4Ba and Cry11Aa to CR7–11). Carlos Muñoz-Garay carried out pore-formation assays of Cry4Ba oligomer in black lipid bilayers. Isabel Gómez performed SPR binding assays of Cry4Ba and Cry11Aa to CR7–11. Amy Evans performed experiments (cadherin gene-silencing assays). Suporn Likitvatanavong performed experiments (cloned the two cadherin gene fragments for dsRNA synthesis and also participated in the cadherin gene-silencing assays). Alejandra Bravo designed experiments, and contributed to materials and artwork. Sarjeet Gill designed experiments and contributed to materials. Mario Soberón designed experiments, contributed to materials and wrote the paper.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Lizbeth Cabrera for technical assistance.

FUNDING

Research was funded in part by the National Institutes of Health (NIH) [grant number 1R01 AI066014], Dirección General Asuntos del Personal Académico (DGAPA)/Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) [grant numbers IN218608 and IN210208-N] and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) [grant number 81639].

REFERENCES

- Bravo, A., Gill, S. S. and Soberón, M. (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **49**, 423–435.
- Soberón, M., Fernandez, L. E., Pérez, C. and Bravo, A. (2007) Mode of action of mosquitoicidal *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon* **49**, 597–600.
- Pigott, C. R. and Ellar, D. J. (2007) Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 255–281.
- Pacheco, S., Gómez, I., Arenas, I., Saab-Rincon, G., Rodríguez-Almazán, C., Gill, S. S., Bravo, A. and Soberón, 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.
- Arenas, I., Bravo, A., Soberón, M. and 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.
- Gómez, I., Dean, D. H., Bravo, A. and Soberón, M. (2003) Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R₁ receptor interact with loops α -8 and 2 in domain II of Cy1Ab toxin. *Biochemistry* **42**, 10482–10489.
- Gómez, I., Arenas, I., Benitez, I., Miranda-Rios, J., Becerril, B., Grande, R., Almagro, J. C., Bravo, A. and Soberón, M. (2006) Specific epitopes of Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* **281**, 34032–34039.
- Bel, Y. and Escriche, B. (2006) Common genomic structure for the Lepidoptera cadherin-like genes. *Gene* **381**, 71–80.
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A. and Soberón, M. (2002) Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* **513**, 242–246.
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S. S. and Soberón, M. (2004) Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta* **1667**, 38–46.
- Pardo-López, L., Gómez, I., Rausell, C., Sánchez, J., Soberón, M. and Bravo, A. (2006) Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by *N*-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. *Biochemistry* **45**, 10329–10336.
- Likitvatanavong, S., Chen, J., Evans, A. E., Bravo, A., Soberón, M. and Gill, S. S. (2011) Role of cadherin, alkaline phosphatase and aminopeptidase N as receptors of Cry11Ba toxin from *Bacillus thuringiensis jegasan* in *Aedes aegypti*. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 2829–2838.
- Chen, J., Aimanova, K. G., Fernandez, L. E., Bravo, A., Soberón, M. and Gill, S. S. (2009) *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biochem. J.* **424**, 191–200.
- Fernandez, L. E., Aimanova, K. G., Gill, S. S., Bravo, A. and 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.
- Chen, J., Aimanova, K. G., Pan, S. and Gill, S. S. (2009) Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11Aa toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**, 688–699.
- Delecluse, A., Poncet, S., Klier, A. and 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.
- Chang, C., Yu, Y. M., Dai, S. M., Law, S. K. and Gill, S. S. (1993) High-level cryIVD and cytA gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 815–821.
- Pérez, C., Muñoz-Garay, C. C., Portugal, L., Sánchez, J., Gill, S. S., Soberón, M. and Bravo, A. (2007) *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. *Cell. Microbiol.* **9**, 2931–2937.
- Rausell, C., Muñoz-Garay, C., Miranda-CassoLuengo, R., Gómez, I., Rudiño-Piñera, E., Soberón, M. and Bravo, A. (2004) Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. *Biochemistry* **43**, 166–174.

- 20 Cancino-Rodezno, A., Alexander, C., Villaseñor, R., Pacheco, S., Porta, H., Pauchet, Y., Gill, S. S., Soberón, M. and 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
- 21 Park, Y., Hua, G., Abdullah, M. A., Rahman, K. and Adang, M. J. (2009) Cadherin fragments from *Anopheles gambiae* synergize *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba's toxicity against *Aedes aegypti* larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 7280–7282
- 22 Park, Y., Abdullah, M. A., Taylor, M. D., Rahman, K. and Adang, M. J. (2009) Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa and Cry3Bb toxicities to coleopteran larvae by a toxin-binding fragment of an insect cadherin. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 3086–3092
- 23 Chen, J., Hua, G., Jurat-Fuentes, J. L., Abdullah, M. A. and Adang, M. J. (2007) Synergism of *Bacillus thuringiensis* toxins by a fragment of a toxin-binding cadherin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 13901–13906
- 24 Pacheco, S., Gómez, I., Gill, S. S., Bravo, A. and Soberón, M. (2009) Enhancement of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins by fragments of a toxin-binding cadherin correlates with oligomer formation. *Peptides* **30**, 583–588
- 25 Fabrick, J., Oppert, C., Lorenzen, M. D., Morris, K., Oppert, B. and 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
- 26 Valaitis, A. P. (2011) Localization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin-binding molecules in gypsy moth larval gut using fluorescence microscopy. *J. Invertebr. Pathol.* **108**, 69–75
- 27 Likitvitanavong, S., Katzenmeier, G. and Angsuthanasombat, C. (2006) Asn¹⁶³ in $\alpha 5$ is essential for oligomerisation and toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin. *Arch. Biochem. Biophys.* **445**, 46–55
- 28 Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D. J. and Li, J. (2005) Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* **348**, 363–382
- 29 Tavecharenkool, T., Angsuthanasombat, C. and Kantchanawarin, C. (2010) Combined molecular dynamics and continuum solvent studies of the pre-pore Cry4Aa trimer suggest its stability in solution and how it may form a pore. *PMC Biophys.* **3**, 1–16
- 30 Dechklar, M., Tiwesi, K., Angsuthanasombat, C. and 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

Received 30 August 2011/31 January 2012; accepted 14 February 2012
Published as BJ Immediate Publication 14 February 2012, doi:10.1042/BJ20111579



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

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

4. Protein-protein interaction detection on membrane supports

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

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

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

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

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

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

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

Introduction

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

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

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

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

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

Experimental design

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

Immobilizing supports for protein transfer

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

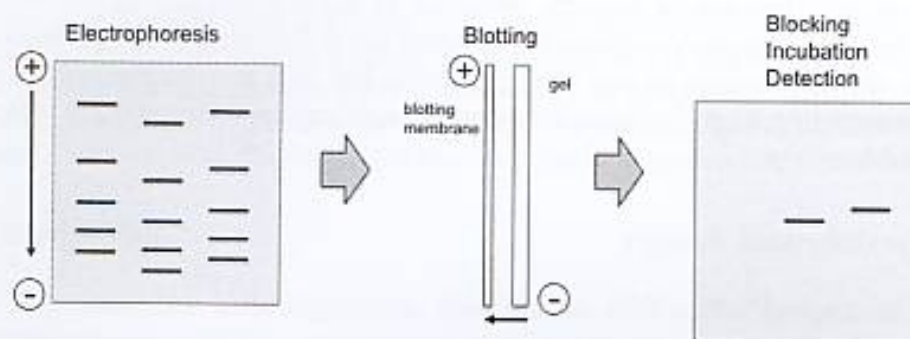


Figure 1. Esquematic of Far western blotting and detection.

Table I. Factors that affect Far WB results.

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

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

Membrane choice

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

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

Table II. Membrane supports for protein transfer.

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

Buffers used in transfer protocols

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

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

Note on transfer of large and small proteins

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

Large proteins (>100 kDa)

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

Small proteins (<100 kD)

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

Techniques to transfer proteins from gel to membrane

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

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

Simple diffusion

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

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

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

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

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

Vacuum blotting

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

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

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

Electroblotting

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

Wet transfer

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

Semi-dry transfer

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

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

Blot incubation conditions

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

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

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

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

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

Detection systems

Alkaline phosphatase

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

Colorimetric detection

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

Table III. Conditions to consider when optimizing Far WB.

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

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

Fluorescence detection

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

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

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

Chemiluminescence detection

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

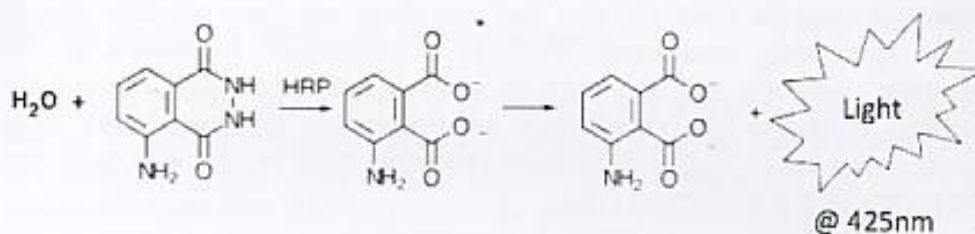


Figure 2. Chemiluminescence reaction scheme.

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

Common problems

No signal

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

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

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

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

Signal fades quickly

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

High background

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

New bottle of substrate does not produce a signal

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

Brown or yellow bands on the membrane

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

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

Bands or entire blot glowing in the darkroom

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

Ghost/hollow bands

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

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

Acknowledgments

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

References

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