

DEPARTAMENT DE GENÈTICA

ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES MOLECULARES DE
LA TOXINA Cry3Aa DE *BACILLUS THURINGIENSIS* EN LA
MEMBRANA DEL EPITELIO INTESTINAL DE
LEPTINOTARSA DECEMLINEATA (ESCARABAJO DE LA
PATATA).

CAMILA OCHOA CAMPUZANO

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 22 de juliol de 2011 davant un tribunal format per:

- Dra. María Dolores Garcerá Zamorano
- Dr. Joel González Cabrera
- Dr. Neil Crickmore
- Dra. María Luz Valero Rustarazo
- Dr. Manuel Porcar Miralles

Va ser dirigida per:

Dra. Carolina Rausell Segarra

Dra. María Dolores Real García

©Copyright: Servei de Publicacions
Camila Ochoa Campuzano

I.S.B.N.: 978-84-370-8790-0

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115



VNIVERSITATIS VALÈNCIAE

Departamento de Genética

Análisis de las interacciones moleculares de la toxina Cry3Aa de
Bacillus thuringiensis en la membrana del epitelio intestinal de
Leptinotarsa decemlineata (escarabajo de la patata)

Memoria presentada por Dña. Camila Ochoa Campuzano para optar al grado de
Doctora en Ciencias Biológicas por la Universitat de València
Dirigida por la Dra. Carolina Rausell Segarra
y la Dra. María Dolores Real García

2011

Dra. Carolina Rausell Segarra, Profesora Titular de Universidad, y Dra. María Dolores Real García, Catedrática de Universidad, del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València.

CERTIFICAN: que Dña. Camila Ochoa Campuzano, Licenciada en Bioquímica por la Universidad de La Habana, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación recogido en esta memoria que lleva por título “Análisis de las interacciones moleculares de la toxina Cry3Aa de *Bacillus thuringiensis* en la membrana del epitelio intestinal de *Leptinotarsa decemlineata* (escarabajo de la patata)”, con el fin de optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas por la Universitat de València y,

AUTORIZAN: su presentación en el Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas para tal fin.

Para que así conste, y en cumplimiento de la legislación vigente, firmamos el presente certificado en Burjassot a 3 de junio de 2011.

Fdo. Carolina Rausell Segarra

Fdo. María Dolores Real García

Agradecimientos

A mis directoras, Carolina Rausell y Loles Real, por aceptarme para hacer la tesis cuando muy poco sabían de mí. Por todo lo que me han enseñado, por la confianza que han depositado en mí y por su ayuda en la realización de este trabajo, y también en otros aspectos de mi vida.

A mis compañeros del grupo de Genética Bioquímica y Molecular, Jesko, Mariola y Jorge, que sólo han estado de paso, y Amparo Martínez, que está siempre. A las estudiantes colaboradoras, María José, Marta, María y Raquel, por mantenernos la colonia del escarabajo de la patata. A Fany, por la paciencia que ha tenido con todas mis manías, por las clases de valenciano y por lo mucho que juntas nos hemos reído. Y en especial a Inma, por una infinidad de cosas, pero sobre todo por su amistad, por escuchar mis dudas y aconsejarme sabiamente, por su ayuda en todo lo que ha estado a su alcance y más, por aquel viaje a Roma y lo que ha sucedido después.

A todos mis compañeros del Departamento de Genética, en especial a Bea, Juanma, Amparo, Cristina y Yaiza, por los buenos ratos que hemos pasado, dentro y fuera del Departamento, y también por la compañía y los ánimos en los malos momentos. A José Luis por los consejos sobre las interminables etapas previas a la lectura. A todos los miembros del Personal de Administración y Servicios. Al programa “V Segles” de la Universitat de València por la financiación para la realización de esta tesis.

A Carmen Morenilla, Vicente Bañuls, Alfonso García Ninet y Eva Llorens, por su gran ayuda a mi llegada a Valencia.

A mi familia y amigos a ambos lados del Atlántico. A mi abuela, mi prima Ingrid y mi papá. Y en especial a mi mamá, por hacer posible que iniciara esta etapa que tanto ha cambiado nuestras vidas, por su apoyo constante *in situ* y transoceánico, y sobre todo por transmitirme al menos una parte de sus ansias de saber y del rigor necesario para satisfacerlas.

A Miguel, a quien justo le ha tocado la parte más dura de esta tesis, y que ha sabido hacérmela más llevadera. Por el cariño, por lo que compartimos, por su sentido del humor.

A mi madre y a Miguel

[...] hay que mantener a raya [...] a los escarabajos de caparazón rayado que ponen sus huevos en el envés de las hojas de las berenjenas y las patatas y pueden comérselas enteras con su mordedura ínfima y tenaz. [...] Cuando yo era más pequeño mi padre [...] me hacía recorrer las hileras de patatas, de berenjenas y pimientos buscando los escarabajos y echándolos a un cubo mediado de agua que llevaba conmigo. Cuando había muchos en el cubo, lo volcaba sobre una zona dura y seca de tierra y los espachurraba a pisotones, y empezaba de nuevo.

Antonio Muñoz Molina, *El viento de la luna*, 2006: 181-182.

El que tenga una canción tendrá tormenta,
el que tenga compañía, soledad.
El que siga un buen camino tendrá sillas
peligrosas que lo inviten a parar.
Pero vale la canción buena tormenta
y la compañía vale soledad.
Siempre vale la agonía de la prisa,
aunque se llene de sillas la verdad.

Silvio Rodríguez, *Historia de las Sillas*, 1969.

Índice

Índice	1
Introducción	7
1-Escarabajo de la patata, <i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Say)	7
1.1-Descripción taxonómica y morfológica	7
1.2-Distribución geográfica	8
1.3-Ciclo de vida	8
1.4-Métodos de control	9
2- <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
3-Toxinas Cry de <i>B. thuringiensis</i> .	13
3.1- Clasificación de las toxinas Cry	13
3.2- Estructura de las toxinas Cry	16
3.3- Modo de acción de las proteínas Cry con estructura en tres dominios	18
3.4- Modelos que explican el mecanismo de toxicidad	26
Objetivos	33
Material y Métodos	37
1- Material biológico utilizado	37
1.1- <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	37
1.2- Cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i>	37
2- Preparación de las BBMV de <i>L. decemlineata</i>	38
3- Aislamiento de células del epitelio intestinal de <i>L. decemlineata</i>	39
4- Separación de fracciones de membrana de MECs de <i>L. decemlineata</i>	39
5- Obtención de la proteína Cry3Aa	40
5.1- Purificación de cristales	40
5.2- Solubilización de cristales de Cry3Aa	41
6- Marcaje de la toxina Cry3Aa con los fluoróforos Cy5 y Cy3	41
7- Procesado proteolítico de la toxina Cry3Aa	42
7.1- Procesado proteolítico de Cry3Aa por tripsina y quimotripsina	42
7.2- Procesado proteolítico de Cry3Aa por BBMV de <i>L. decemlineata</i>	42
7.3- Ensayos de proteólisis de Cry3Aa catalizada por fracciones de membrana obtenidas a partir de MECs	44
8- Ensayos de proteólisis de sustratos sintéticos de proteasas catalizados por BBMV de <i>L. decemlineata</i>	44
9- Separación por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	46
10- Separación por electroforesis bidimensional de la fracción soluble resultante de la incubación de Cry3Aa con BBMV	47
11- Separación por electroforesis bidimensional de proteínas de BBMV de <i>L. decemlineata</i>	48
12- Electrotransferencia de proteínas	50

13- Inmunodetección de proteínas	50
14- Aislamiento del gen de prohibitina-1 de <i>L. decemlineata</i>	52
14.1- Extracción de ARN total de intestinos de <i>L. decemlineata</i>	52
14.2- Síntesis de ADNc	52
14.3- Amplificación por PCR del gen de prohibitina-1	53
15- Amplificación por PCR del gen de la metaloproteasa ADAM10 de <i>L. decemlineata</i>	53
16- Detección de proteínas de BBMV que interactúan con Cry3Aa utilizando el reactivo de entrecruzamiento Sulfo-SBED	54
17- Aislamiento de proteínas de BBMV que unen el péptido pep-rec inmovilizado	56
18- Unión del péptido pep-rec a MECs de <i>L. decemlineata</i>	57
19- Aislamiento de proteínas del intestino de <i>L. decemlineata</i> que unen calmodulina inmovilizada en una matriz de agarosa	58
20- Unión de la toxina Cry3Aa a calmodulina inmovilizada en una matriz de agarosa	58
21- Ensayos de formación de poro de Cry3Aa en BBMV con calceína encapsulada	59
22- Ensayos de citotoxicidad en MECs de <i>L. decemlineata</i>	60
23- Ensayos de toxicidad de Cry3Aa en larvas de <i>L. decemlineata</i>	61
Resultados	65
1- Procesado proteolítico de Cry3Aa por proteasas asociadas al epitelio intestinal de <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	65
1.1- Proteólisis de Cry3Aa catalizada por BBMV de <i>L. decemlineata</i>	65
1.2- Regiones de Cry3Aa por las que tiene lugar la proteólisis catalizada por BBMV de <i>L. decemlineata</i>	67
1.3- Ensayos de inhibición de la proteólisis de Cry3Aa catalizada por BBMV de <i>L. decemlineata</i> .	70
1.4- Evidencias a favor de la proteólisis de Cry3Aa por cisteín y metaloproteasas asociadas a las BBMV de <i>L. decemlineata</i>	72
1.4.1- Identificación de proteasas que proteolizan Cry3Aa en BBMV de <i>L. decemlineata</i> mediante <i>Ligand blot</i>	72
1.4.2- Identificación de proteasas que proteolizan Cry3Aa en BBMV de <i>L. decemlineata</i> utilizando un agente de entrecruzamiento	75
1.4.3- Análisis de la proteólisis de sustratos sintéticos de proteasas catalizada por BBMV de <i>L. decemlineata</i>	80
1.4.3.1- Proteólisis de sustratos sintéticos de cisteín proteasas	80
1.4.3.2- Proteólisis de un sustrato sintético de metaloproteasas tipo astacina.	82
1.4.3.3- Proteólisis de un sustrato sintético de metaloproteasas tipo ADAM.	83
1.4.4- Implicación de una metaloproteasa ADAM asociada a las BBMV de <i>L. decemlineata</i> en la proteólisis de Cry3Aa	84
1.4.4.1- Aislamiento del gen de una metaloproteasa ADAM de <i>L. decemlineata</i>	84
1.4.4.2- Análisis de la región de reconocimiento de Cry3Aa por la metaloproteasa ADAM	85

1.4.4.3- Efecto de moduladores de la actividad de metaloproteasas ADAM en la proteólisis de Cry3Aa	91
2- Interacción de Cry3Aa con proteínas de microdominios de la membrana del epitelio intestinal de <i>L. decemlineata</i>	97
2.1- Aislamiento de microdominios de membrana de células disociadas del epitelio intestinal de <i>L. decemlineata</i>	97
2.2- Unión de Cry3Aa a microdominios de membrana de células disociadas del epitelio intestinal de <i>L. decemlineata</i>	99
2.2.1- Inmunodetección de las proteínas prohibitina-1 y -2 de <i>L. decemlineata</i>	109
2.2.2- Aislamiento del gen de la proteína prohibitina-1 de <i>L. decemlineata</i>	110
2.3- Localización de las actividades cisteín y metaloproteasa que procesan Cry3Aa en los microdominios de membrana de células disociadas del epitelio intestinal	112
3- Significado funcional de la interacción de Cry3Aa con la membrana del epitelio intestinal de <i>L. decemlineata</i>	114
3.1- Interacción de la toxina Cry3Aa quimotripsinizada con las BBMV de <i>L. decemlineata</i>	115
3.2- Formación de poro de Cry3Aa en BBMV de <i>L. decemlineata</i>	117
3.3- Toxicidad de Cry3Aa en <i>L. decemlineata</i>	121
3.3.1- Toxicidad en células disociadas del epitelio intestinal de <i>L. decemlineata</i>	122
3.3.2- Toxicidad en larvas de <i>L. decemlineata</i>	124
Discusión	129
1- Proteólisis de la toxina Cry3Aa catalizada por las BBMV de <i>L. decemlineata</i>	129
2- Compartimentalización de la interacción de la toxina Cry3Aa con proteínas de microdominios de la membrana del epitelio intestinal de <i>L. decemlineata</i>	145
3- Proteínas de la membrana del epitelio intestinal de <i>L. decemlineata</i> que interaccionan con la toxina Cry3Aa	150
4- Significado funcional de la interacción de la toxina Cry3Aa con la membrana del epitelio intestinal de <i>L. decemlineata</i>	162
5- Modelo de mecanismo de toxicidad	168
Conclusiones	173
Bibliografía	177

Introducción

Introducción

1- Escarabajo de la patata, *Leptinotarsa decemlineata* (Say)

Leptinotarsa decemlineata es el insecto defoliador de patata de mayor importancia económica a nivel mundial. Sus principales plantas hospedadoras son *Solanum rostratum*, *Solanum angustifolium* y la patata cultivada (*Solanum tuberosum*). También puede atacar plantas de berenjena (*Solanum melongena*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y de otras especies de Solanáceas cultivadas y silvestres (Jacques, 1988).

Los daños producidos por *L. decemlineata* en las plantas de patata se deben a la acción conjunta de adultos y larvas de diferentes estadios que son capaces de devorar totalmente las hojas de la planta. Durante el estado larvario un único individuo es capaz de consumir cerca de 40 cm² de hojas de patata y en el estado adulto el consumo puede ser de aproximadamente 10 cm² de hojas al día (revisado en Alyokhin, 2009).

Los efectos devastadores de esta plaga no sólo se deben a su gran voracidad, sino también a su elevada fecundidad y a que ha desarrollado resistencia frente a un gran número de los insecticidas químicos que se han utilizado para combatirla.

1.1- Descripción taxonómica y morfológica

La ubicación taxonómica de *L. decemlineata* es la siguiente (Balachowsky, 1963): Phylum: Arthropoda; Clase: Insecta; Orden: Coleoptera; Suborden: Polyphaga; Infraorden: Cucujiformia; Superfamilia: Chrysomeloidea; Familia: Chrysomelidae;

Subfamilia: Chrysomelinae; Género: *Leptinotarsa*; Especie: *L. decemlineata* (Say, 1824).

Los huevos de *L. decemlineata* son de forma ovoide y de color amarillo claro, coloración que se torna anaranjada o rojiza en las etapas previas a la eclosión (Figura 1A). Las larvas son de color rojizo y adquieren un tono más claro en los últimos estadios, en los que también se observa el anillo protorácico en la cabeza y dos filas de manchas negras en los costados del abdomen (Figura 1B). Las pupas son amarillas, de tipo exarata y miden aproximadamente 8 mm (Figura 1C). Los adultos son escarabajos pequeños de aproximadamente 1 cm de longitud. Su color puede variar entre amarillo pálido y ocráceo, con pequeñas manchas negras en la cabeza y el protórax, entre las que destaca una mancha en forma de H en la parte media. Los élitros son de color amarillo pajizo, cada uno con cinco líneas negras longitudinales, a las que alude la denominación específica del insecto (Figura 1D). El nombre genérico *Leptinotarsa* se refiere a la extremada delgadez de sus tarsos, que obliga al adulto a apoyarse en toda su longitud durante la locomoción (Jacques, 1988).

1.2- Distribución geográfica

El escarabajo de la patata es originario de México (Casagrande, 1987). En la actualidad se encuentra ampliamente distribuido por gran parte del mundo y se ha postulado que continuará expandiéndose hacia otras áreas (revisado en Alyokhin, 2009). Su distribución actual cubre un rango de alrededor de 16 millones de km² en América del Norte, Europa y Asia (revisado en Alyokhin, 2009).

1.3- Ciclo de vida

El escarabajo de la patata posee un ciclo de vida complejo, diverso y muy adaptado a los hábitats agrícolas. Los adultos pasan el invierno en diapausa enterrados en el suelo. Emergen en primavera en respuesta al aumento de la temperatura y

comienzan a alimentarse durante un período de entre 5 y 10 días. Después del acoplamiento, las hembras inician la puesta de huevos en plastones de 20 a 60 huevos, preferentemente sobre el envés de las hojas (Harcourt, 1971). Tras cuatro u ocho días, dependiendo de la temperatura, tiene lugar la eclosión y las larvas comienzan a alimentarse de las yemas foliares y las hojas más tiernas. Las larvas pasan por cuatro estadios y completan su desarrollo en un período de 10 a 20 días, según la temperatura (Ferro, 1985). Al final del cuarto estadio las larvas dejan de alimentarse y se entierran en el suelo para pupar. En el transcurso de 8 a 12 días emergen los nuevos adultos (Jacques, 1988).

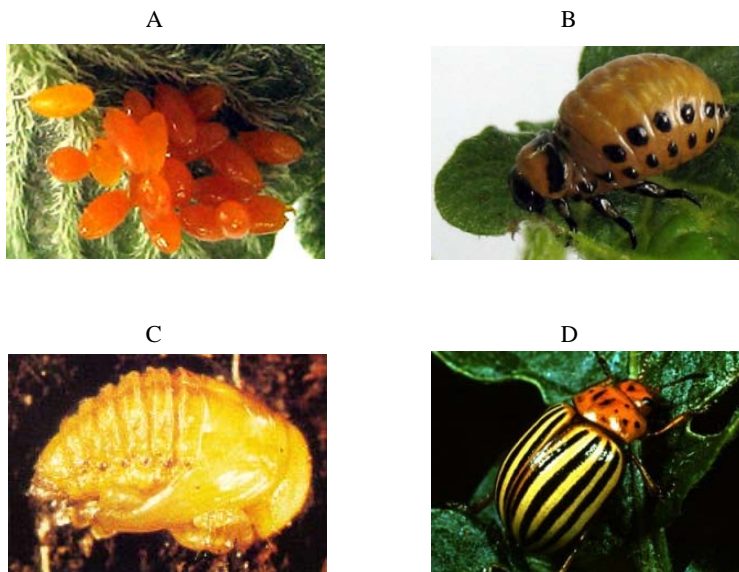


Figura 1.- Ciclo biológico y características morfológicas de *L. decemlineata*.

A) Huevos, B) Larva de cuarto estadio, C) Pupa, D) Adulto.

1.4- Métodos de control

L. decemlineata fue reconocida como plaga de patata en los Estados Unidos a mediados del siglo XIX. Desde esa fecha y hasta la actualidad se han puesto en práctica diferentes estrategias para su control, entre las cuales el empleo de

insecticidas basados en compuestos químicos ha resultado el método más eficaz y en consecuencia el más utilizado.

El primer compuesto químico que resultó efectivo para controlar el escarabajo de la patata fue el insecticida “verde de parís” (acetoarsenito de cobre), descubierto por Riley (1871), cuyo empleo se generalizó rápidamente entre los agricultores de la época. Dicho compuesto fue posteriormente sustituido por otros arsenicales. A mediados de la década de los 40 del pasado siglo el insecticida químico más utilizado era el DDT (Gauthier *et al.*, 1981), al cual le siguieron los organofosforados, carbamatos, y ciclodienos organoclorados, entre otros insecticidas químicos (Casagrande, 1987).

La alta presión selectiva sobre las poblaciones de *L. decemlineata* ejercida por los insecticidas químicos, entre otros factores, ha favorecido la selección de poblaciones resistentes a la gran mayoría de estos compuestos. En 1952 se registraron los primeros casos de resistencia a DDT, que tuvieron lugar en los Estados Unidos y en España (Quinton, 1955; Forgash, 1987). Desde entonces y hasta la actualidad, en diversas partes del mundo, muchas poblaciones de *L. decemlineata* han desarrollado resistencia a un amplio rango de insecticidas químicos, incluyendo arsenicales, organoclorados, carbamatos, organofosforados y piretroides (revisado en Alyokhin, 2009).

Si bien la utilización de insecticidas sintéticos ha resultado el método más efectivo para el control de *L. decemlineata*, la demostrada capacidad de este insecto para desarrollar resistencia frente a estos compuestos y el negativo impacto ambiental derivado de su utilización señalan la necesidad de encontrar nuevas alternativas para el control de esta plaga.

Entre las diversas alternativas que se ha intentado emplear para el control del escarabajo de la patata se encuentra el control biológico. Existen diversos artrópodos que son depredadores naturales de *L. decemlineata*, así como nemátodos y hongos entomopatogénicos, no obstante, ninguno de estos enemigos naturales ha resultado una opción valiosa en el control del escarabajo de la patata (Ferro, 1994).

Los bioinsecticidas basados en la bacteria *Bacillus thuringiensis* constituyen otra de las alternativas biológicas para el control de esta plaga, ya que son compuestos altamente específicos para sus dianas e inoos para los vertebrados, la gran mayoría de los invertebrados beneficiosos y para el medio ambiente en general. Se han desarrollado bioinsecticidas basados en las variedades *san diego* o *tenebrionis* de *B. thuringiensis* tales como Trident®, M-One®, M-Trak® y Novodor®, que pueden ser utilizados satisfactoriamente en el control de *L. decemlineata*. De ellos, el bioinsecticida Novodor® se encuentra registrado en el Registro de Productos Fitosanitarios del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (1992-2014), lo cual permite su comercialización en España.

Adicionalmente, las toxinas producidas por esta bacteria se han empleado en la construcción de plantas de patata resistentes al escarabajo de la patata. Entre los años 1995 y 2000 se comercializó en los Estados Unidos una variedad de patata transgénica que expresaba la toxina Cry3Aa de *B. thuringiensis* (patatas-Bt) (Feldman y Stone, 1997). Tras dicho período dejó de utilizarse, fundamentalmente por la preocupación de los consumidores acerca de los alimentos transgénicos, de los agricultores por su menor rendimiento agronómico en comparación con las plantas no modificadas, y por la competencia con el insecticida Imidacloprid® (Grafius y Douches, 2008) frente al cual el escarabajo de la patata también ha desarrollado resistencia (Tan *et al.*, 2008).

El éxito de la perdurabilidad del escarabajo de la patata como plaga durante más de 150 años se debe su alta fecundidad, su diverso y flexible ciclo de vida y a su extraordinaria adaptabilidad. Es por ello que el manejo de esta plaga no debe centrarse en una única estrategia, sino en la integración de técnicas de control diversas que estén basadas en el conocimiento científico de su biología y en el respeto al medio ambiente. En ese sentido, el empleo de la toxina Cry3Aa de *B. thuringiensis*, con un conocimiento adecuado de su mecanismo de acción tóxica en *L. decemlineata*, constituye una estrategia efectiva para el control de esta plaga sin provocar efectos perjudiciales sobre el medio ambiente.

2- *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram-positiva, aerobia y esporulante. Está estrechamente relacionada con otras especies de bacterias de su mismo género, como *B. cereus*, *B. anthracis* y *B. mycoides* (Priest *et al.*, 2004).

Es una bacteria ubicua que puede encontrarse de manera natural en el suelo y en otros nichos ecológicos como agua, hojas de plantas, granos almacenados o restos de insectos muertos (Schnepf *et al.*, 1998).

Fue descubierta en 1901 en Japón, por el bacteriólogo S. Ishiwata, quien la aisló de un gusano de seda enfermo. Una década después, en Turingia (Alemania), Berliner aisló de una larva enferma de *Anagasta kuehniella* una bacteria similar a la descubierta por Ishiwata a la que denominó *Bacillus thuringiensis*.

Se trata de una bacteria entomopatogénica cuya toxicidad principalmente se atribuye a la producción de inclusiones cristalinas paraesporales que pueden contener una o más proteínas insecticidas, también denominadas δ -endotoxinas, las cuales pueden clasificarse en dos grandes grupos: Cry (de cristalinas) y Cyt (de citolíticas).

Las toxinas Cry se definen como proteínas cristalinas paraesporales producidas por Bt que poseen algún efecto tóxico experimentalmente verificable frente a un organismo diana. En esta definición igualmente se incluyen otras proteínas con elevada homología de secuencia a proteínas Cry conocidas (Crickmore *et al.*, 1998). Las toxinas Cyt presentan actividad citolítica y hemolítica *in vitro* e *in vivo* y son fundamentalmente tóxicas para dípteros (Guerchicoff *et al.*, 1997). Estas toxinas se definen como proteínas cristalinas paraesporales producidas por Bt que muestran actividad hemolítica, o como cualquier proteína que posea homología de secuencia con proteínas Cyt conocidas (Crickmore *et al.*, 1998).

Además de las proteínas producidas durante la esporulación, Bt expresa y secreta al medio durante el crecimiento vegetativo otra clase de toxinas denominadas Vip que no forman cristales y poseen actividad insecticida principalmente frente a lepidópteros y coleópteros (Estruch *et al.*, 1996, Warren, 1997).

Se han identificado un gran número de cepas diferentes de Bt que producen toxinas altamente específicas para sus dianas, pero que en conjunto pueden resultar tóxicas para un amplio rango de órdenes de insectos tales como lepidópteros, coleópteros, dípteros, himenópteros, homópteros, ortópteros y malófagos, así como también para otros organismos como nemátodos, ácaros y protozoos (Feitelson *et al.*, 1992). Debido a la producción de toxinas con actividad insecticida que son inocuas para los vertebrados, la gran mayoría de los invertebrados beneficiosos y las plantas, y por ser completamente biodegradables, se han utilizado numerosas cepas de Bt para el control biológico de insectos plaga de la agricultura y de vectores de enfermedades, en forma de bioinsecticidas y plantas transgénicas (Schnepf *et al.*, 1998).

3-Toxinas Cry de *B. thuringiensis*

Las proteínas Cry constituyen el grupo de toxinas producidas por Bt más numeroso y también el que más se ha estudiado. En conjunto, estas proteínas son activas contra especies pertenecientes a varios órdenes de insectos entre los que se encuentran importantes plagas de la agricultura, forestales y vectores de enfermedades.

3.1- Clasificación de las toxinas Cry

Las toxinas Cry se han clasificado y nombrado según la homología de su estructura primaria considerando cuatro rangos diferentes basados en el grado de homología entre sus secuencias aminoacídicas (Figura 2). El primer rango se designa con un número arábigo (Cry3, por ejemplo) y en él se clasifican proteínas con al menos un 45% de identidad. El segundo rango se designa con una letra mayúscula (Cry3A, por ejemplo) y en él se agrupan proteínas que como mínimo posean una identidad del 78%. El tercer rango se designa por una letra minúscula y lo integran proteínas con al menos un 95% de identidad (Cry3Aa, por ejemplo). En el cuarto rango se agrupan proteínas que posean una identidad de secuencia primaria de más del 95%, y se designa con un número arábigo (Cry3Aa1, por ejemplo) (Crickmore *et al.*, 1998).

Actualmente existen 68 grupos de proteínas Cry, según el primer rango de clasificación, compuestos por alrededor de 218 holotipos de toxinas (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/; actualización noviembre de 2010).

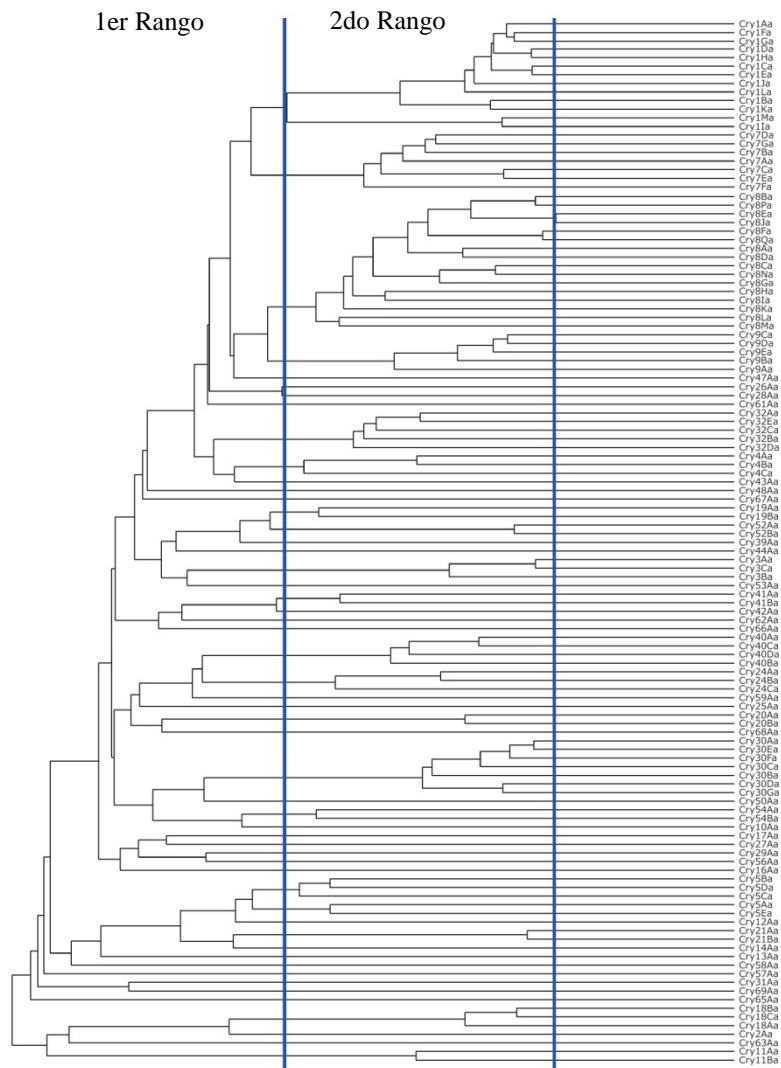


Figura 2.- Dendrograma de las proteínas Cry con estructura de tres dominios.

Las líneas verticales indican los límites de identidad que marcan los tres primeros rangos de nomenclatura.

Tomado de http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/. Actualización de noviembre de 2010.

El análisis filogenético de las estructuras primarias de las proteínas Cry ha permitido clasificarlas en varios grupos que no están relacionados entre sí (de Maag *et al.*, 2003). De ellos, el más numeroso está formado por la familia de proteínas Cry que poseen una estructura tridimensional compuesta por tres dominios globulares de aproximadamente 200 aminoácidos cada uno (proteínas Cry-3d), con una organización modular respecto a la secuencia polipeptídica desde los extremos N-terminal al C-terminal. Estas toxinas, en conjunto, son activas contra lepidópteros, coleópteros, dípteros, himenópteros y nemátodos (Figura 3). Entre ellas, los grupos de toxinas Cry3A, Cry3B y Cry3C codificadas por la clase de genes *cry3*, presentes en las subespecies de *B. thuringiensis tenebrionis*, *san diego*, *morrisoni*, *tolworthi* y *galleriae*, muestran actividad específica contra coleópteros (Krieg *et al.*, 1983; Hernstadt *et al.*, 1986; Hernstadt *et al.*, 1987; Sick *et al.*, 1990). En particular, se ha descrito la susceptibilidad de *L. decemlineata* a las toxinas Cry3 de Bt (Donovan *et al.*, 1992; Lambert *et al.*, 1992, Haffani *et al.*, 1996).

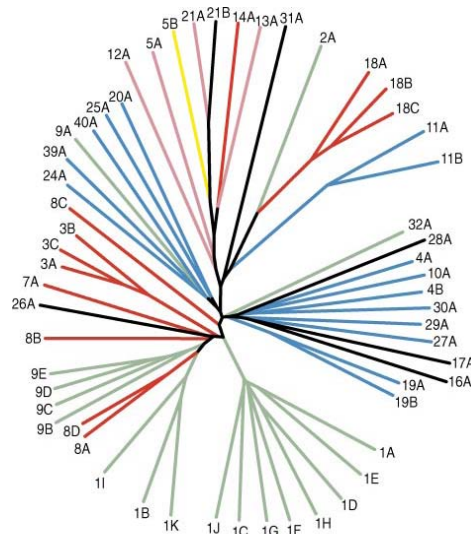


Figura 3.- Relaciones filogenéticas de las toxinas Cry con estructura de tres dominios. Los colores de las ramas están relacionados con la especificidad de orden de insecto de cada toxina. Las ramas rojas representan las toxinas específicas contra coleópteros, las verdes las específicas para lepidópteros, las azules las específicas para dípteros, las magenta las específicas para nemátodos y las amarillas las específicas hacia himenópteros. Tomado de de Maag *et al.*, 2003.

Otro de los grupos de proteínas Cry que no presenta homología con las estructuradas en tres dominios globulares está compuesto por las proteínas de la toxina binaria de *Bacillus sphaericus* y las toxinas Cry36 y Cry35 de Bt. De ellas, la proteína Cry35 forma una toxina binaria junto a la proteína Cry34 de Bt, que no pertenece a ninguno de estos grupos, dicha toxina binaria es activa contra el coleóptero *Diabrotica virgifera virgifera*. Un tercer grupo está compuesto por las toxinas mosquitocidas de *B. sphaericus* (Mtx2 y Mtx3), entre otras toxinas bacterianas y por las toxinas Cry15A, CryC53, Cry23A y Cry38A de Bt (revisado en de Maag *et al.*, 2003).

3.2- Estructura de las toxinas Cry

Hasta la fecha se han resuelto las estructuras tridimensionales de varias de las toxinas Cry con estructura globular compuesta por tres dominios, tales como las toxinas Cry3Aa (Li *et al.*, 1991) (Figura 4) y Cry3Bb (Galitsky *et al.*, 2001), específicas para coleópteros, Cry1Aa (Borisova *et al.*, 1994; Grochulski *et al.*, 1995), específica para lepidópteros, Cry4Aa (Boonsern *et al.*, 2006) y Cry4Ba (Boonsern *et al.*, 2005), tóxicas para dípteros, y de la toxina Cry2Aa (Morse *et al.*, 2001) activa contra lepidópteros y dípteros. La comparación de dichas estructuras ha confirmado la marcada similitud en los tres dominios, a pesar de la baja homología de secuencia primaria y la diferencia en especificidad. Dicha similitud de estructura ha permitido proponer que las toxinas Cry comparten un mecanismo de acción común.

El dominio I de las toxinas Cry está constituido por un agrupamiento de siete hélices α en el que seis hélices anfipáticas rodean a una hélice central que es hidrofóbica. Este dominio fue inicialmente descrito en la toxina Cry3Aa por Li *et al.* (1991) y se ha implicado en la formación del poro porque posee hélices α con longitud suficiente como para atravesar la bicapa lipídica y con una superficie anfipática en toda su longitud (hélices α -3 y α -7, en el caso de Cry3Aa), como cabría esperar de una estructura que se inserte en la membrana y forme un poro hidrofílico (Li *et al.*, 2001). Del mismo modo, el dominio I posee similitud estructural con las regiones formadoras de poros de otras toxinas bacterianas, como

la hemolisina E, las colicinas Ia y N y el dominio de translocación en la membrana de la toxina diftérica (de Maagd *et al.*, 2003). El dominio II es un prisma β constituido por tres hojas β antiparalelas con topología similar y empaquetadas alrededor de un núcleo hidrofóbico (Li *et al.*, 1991). Este dominio se ha involucrado en la interacción con el receptor (Li *et al.*, 1991) y existen estudios de mutagénesis que sustentan dicha hipótesis (Jenkins y Dean, 2000). Igualmente, el dominio II se ha relacionado con la determinación de la especificidad hacia el insecto diana, ya que representa la parte más divergente de la secuencia de la proteína, en particular en los ápices de los lazos y porque su intercambio entre toxinas muy relacionadas produce híbridos activos con especificidad alterada (revisado en Li *et al.*, 2001). El dominio III consiste en dos láminas β antiparalelas que forman un sándwich β (Li *et al.*, 1991). Los resultados obtenidos en ensayos de mutagénesis dirigida e intercambio de dominios (de Maag *et al.*, 1996) han permitido postular que este dominio también puede estar involucrado en la interacción con el receptor. Otras evidencias experimentales apuntan a que también esté implicado en la formación del poro (Schnepf *et al.*, 1998). El dominio III posee una elevada homología con módulos de unión a carbohidratos presentes en otras proteínas bacterianas, lo cual sugiere que algunas toxinas Cry podrían unir carbohidratos a través de este dominio (de Maag *et al.*, 2003).



Figura 4.- Estructura tridimensional de la toxina Cry3Aa
Los números romanos identifican cada dominio. Tomado de Li *et al.*, 1991.

3.3- Modo de acción de las proteínas Cry con estructura de tres dominios

La ingestión de las toxinas Cry por una larva susceptible provoca una serie de procesos en su intestino que conducen a cambios fisiológicos y a su muerte. Generalmente el intestino se paraliza, cesa la ingestión de alimentos y la larva muere en pocos días (Heimpel y Angus, 1959).

En la actualidad se conocen un elevado número de toxinas Cry específicas para diferentes insectos. En gran medida, como consecuencia de dicha diversidad, el mecanismo molecular a través del cual las proteínas Cry ejercen su acción tóxica es un tema controvertido y objeto de intensa investigación. En general, se acepta que es un proceso que consta de varias etapas que comprenden la solubilización del cristal en el intestino del insecto diana con la consecuente liberación de la protoxina, la activación proteolítica y la unión de la toxina activa a los receptores específicos en la membrana del epitelio intestinal (revisado en Soberón *et al.*, 2009). Sin embargo, existen discrepancias relacionadas con la manera en que la unión de la toxina a sus receptores genera toxicidad (revisado en Pigott y Ellar, 2007). Muchos investigadores coinciden en que tiene lugar la oligomerización de la toxina y su inserción en la membrana con la consiguiente formación de poros, que permiten la entrada de iones y agua, provocando la hinchazón de las células columnares, la lisis celular y finalmente la muerte del insecto (Knowles y Ellar, 1987; Bravo *et al.*, 2004) (Modelo de formación de poro). Recientemente se ha propuesto un mecanismo alternativo que plantea que la interacción de la toxina monomérica con su receptor activa una cascada de señalización celular dependiente de iones Mg^{2+} que produce la muerte celular por oncosis (Zhang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006) (Modelo de transducción de la señal).

- Solubilización del cristal

Los cristales producidos por Bt deben solubilizarse en el intestino de los insectos antes de producir su efecto. Para las toxinas Cry1 la solubilización está mediada por el pH alcalino y las condiciones reductoras en el intestino de lepidópteros (Dow, 1986). Por el contrario, el pH del intestino de la mayoría de las especies de coleópteros es neutro o ácido (Koller *et al.*, 1992; Purcell *et al.*, 1992), condiciones en las que la solubilidad de Cry3Aa *in vitro* es limitada (Koller *et al.*, 1992). Se ha

postulado que la presencia de surfactantes (Martin y Martin, 1984) u otros factores, como enzimas digestivas, en el intestino de los coleópteros podría contribuir a la solubilidad de Cry3Aa *in vivo* y en consecuencia a aumentar su disponibilidad.

- **Activación proteolítica de las toxinas**

Las toxinas Cry son polipéptidos de entre 130 y 140 kDa, como en el caso de las toxinas Cry1 y Cry4, o de aproximadamente 70 kDa, como las toxinas Cry2 y Cry3. Una vez solubilizadas en el intestino de los insectos deben activarse proteolíticamente para ser tóxicas.

La activación es un proceso complejo en el cual están implicadas proteasas solubles del intestino de los insectos, que en el caso de dípteros y lepidópteros suelen ser serín proteasas (Terra y Ferreira, 1994). En los coleópteros, las proteasas digestivas mayoritarias son cisteín proteasas (Murdock *et al.*, 1987; Bolter y Jongstma, 1995) y en el caso de *L. decemlineata*, las aspartil proteasas también contribuyen en gran medida a la actividad proteolítica intestinal. Igualmente, aunque en cantidades minoritarias, se han identificado actividades de serín proteasas digestivas al menos en insectos pertenecientes a siete familias diferentes de coleópteros, entre los que se encuentra *L. decemlineata* (Christeller *et al.*, 1989; Colepico-Neto *et al.*, 1987; Hernández *et al.*, 2003; Novillo *et al.*, 1997; Oppert *et al.*, 2002; Vaje *et al.*, 1984; Zhu y Baker, 2000).

La activación proteolítica de las toxinas de 130 kDa comprende cortes en los extremos C- y N-terminal que originan toxinas activas de alrededor de 60 kDa (Schnepf *et al.*, 1998). Las toxinas de alrededor de 70 kDa, entre las que se encuentra Cry3Aa, de 73 kDa, se consideran una versión naturalmente truncada de las toxinas de 130 kDa, ya que les falta el dominio C-terminal (Höfte *et al.*, 1987). Aunque no se haya establecido que para estas toxinas tenga lugar una activación proteolítica tan extensa como la que sufren las toxinas de 130 kDa, se ha descrito que la toxina Cry3Aa de 73 kDa, producida por *Bt tenebrionis*, se procesa rápidamente en el extremo N-terminal perdiendo de 49 a 57 residuos, durante o tras la formación del cristal, para producir una proteína de 67 kDa (Höfte *et al.*, 1987; McPherson *et al.*, 1988; Carroll *et al.*, 1989). Dicho procesamiento N-terminal de Cry3Aa resulta en una estructura más tóxica que la toxina nativa (Carroll *et al.*,

1989). La forma de 73 kDa puede predominar en inclusiones producidas por *Bt tenebrionis* crecida en un medio rico en nutrientes, probablemente debido a una baja producción de proteasas bacterianas (Carroll *et al.*, 1997).

Ensayos de proteólisis de Cry3Aa *in vitro*, catalizados por las serín proteasas digestivas tripsina y quimotripsina mostraron que sólo el fragmento de Cry3Aa de 49 kDa generado por el tratamiento con quimotripsina fue capaz de unirse a las vesículas de membrana del borde en cepillo (BBMV, por sus siglas en inglés) de *L. decemlineata*, en comparación con la toxina sin procesar o tripsinizada (Martínez-Ramírez y Real, 1996). En el citado trabajo, igualmente se describió que el procesado proteolítico de Cry3Aa por el jugo intestinal de *L. decemlineata* generó un fragmento de la toxina de 44 kDa, así como uno de 42 kDa, probablemente proveniente del de 44 kDa. Martínez-Ramírez y Real (1996) señalaron que dichos fragmentos podrían ser generados *in vivo* por una actividad proteolítica similar a la quimotripsina, la cual originó *in vitro* un fragmento de toxina de 49 kDa.

Carroll *et al.* (1997) igualmente analizaron el procesamiento de Cry3Aa por quimotripsina y observaron que dicho tratamiento principalmente produjo un fragmento de toxina de 49 kDa, aunque también se obtuvieron péptidos de alrededor de 11 a 6 kDa que permanecieron asociados en solución. Estos autores señalaron que dichos fragmentos se originaron como producto de dos cortes proteolíticos, al inicio de la hélice α -4 del dominio I y al final de la hoja β -19 del dominio III de la estructura de Cry3Aa y que la aparición del fragmento de 49 kDa tras la digestión por quimotripsina podría ocurrir a través de la formación de un fragmento de 55 kDa. Según Carroll *et al.* (1997), lo más relevante en relación al procesado de Cry3Aa por quimotripsina fue la aparición de una forma de la toxina soluble en el rango de pH del intestino de los coleópteros en el cual no son solubles ni la toxina de 67 kDa, ni la toxina tripsinizada. La toxina quimotripsinizada retuvo totalmente su toxicidad frente a *L. decemlineata* y *Phaedon cochleariae*. De acuerdo con los resultados descritos por Martínez-Ramírez y Real (1996), la toxina quimotripsinizada fue capaz de unirse a las BBMV de *L. decemlineata*, a diferencia de la toxina sin procesar o la toxina proteolizada con tripsina (Carroll *et al.*, 1997).

En el trabajo de Carroll *et al.* anteriormente citado también se analizó el procesamiento *in vivo* de la toxina Cry3Aa, para lo cual se llevó a cabo un ensayo

en el que se hizo ingerir a larvas de *L. decemlineata* toxina sin procesar marcada con I¹²⁵, encontrándose en el contenido intestinal, no asociados a la membrana, fragmentos de toxina de 67, 55 y 49 kDa. En contraste, la toxina quimotripsinada no continuó procesándose tras la ingestión (Carroll *et al.*, 1997). Estos resultados llevaron a los autores a proponer que aunque las proteasas digestivas mayoritarias de *L. decemlineata* fuesen cisteín y aspartil proteasas, en el intestino de *L. decemlineata* debía existir una actividad proteolítica de tipo quimotripsina o similar que estuviese implicada en el modo de acción de Cry3Aa en este insecto.

Recientemente Walters *et al.* (2008) introdujeron una modificación en el gen de Cry3A que dio como resultado la proteína mCry3A con mayor actividad tóxica frente a larvas de primer estadio de *D. virgifera virgifera* que la toxina silvestre. Dicha toxina se obtuvo mediante la introducción de un sitio de corte para quimotripsina y catepsina G en el lazo que une las hélices α -3 y α -4 del dominio I, cercano al sitio de corte por quimotripsina descrito por Carroll *et al.* (1997) en la toxina silvestre. *In vitro*, la proteína mCry3A de 67 kDa se procesó totalmente por quimotripsina a un fragmento de 55 kDa de una manera más rápida de lo que se procesó la toxina silvestre. El procesamiento *in vivo* de mCry3A a un fragmento de 55 kDa también fue más rápido que el de Cry3Aa. Dicho procesado se inhibió en presencia de quimostatina, que es un inhibidor específico de quimotripsina, lo cual sugirió la existencia de actividad quimotripsina/catepsina G en el intestino de las larvas de *Diabrotica*. Al igual que había sido descrito para la toxina silvestre en *L. decemlineata* (Martínez-Ramírez y Real, 1996; Carrol *et al.*, 1997), sólo el procesado con quimotripsina de la toxina modificada mCry3A permitió su unión específica a las BBMV de *Diabrotica*. Estos autores han sugerido que la adición de dicho sitio de reconocimiento por quimotripsina/catepsina G le permitió a la toxina mCry3A ser procesada al mismo fragmento estable de 55 kDa al que se procesa la toxina silvestre, pero de una manera más fácil y rápida, probablemente porque el sitio introducido se encuentra en una región más expuesta que facilitaría la interacción inicial con la enzima. Estos autores encontraron que la mutación presente en mCry3A no alteró adversamente la toxicidad frente a larvas de *L. decemlineata* (Walters *et al.*, 2008).

Una parte considerable de las investigaciones relacionadas con la activación proteolítica de las toxinas Cry se ha centrado en la actividad o composición de las proteasas intestinales, puesto que se ha postulado que influyen en la susceptibilidad de los insectos a estas toxinas y que además pueden estar implicadas en la especificidad de Bt para diferentes especies de insectos y el desarrollo de resistencia (Oppert, 1999). En ese sentido, Oppert *et al.* (1997) describieron la existencia de dos cepas resistentes de *Plodia interpunctella* a las toxinas Cry de Bt en las que estaba ausente una proteasa mayoritaria del intestino involucrada en la activación de la toxina. Del mismo modo, la degradación excesiva de toxinas se ha implicado en la insensibilidad a Bt. Forcada *et al.* (1996) encontraron en una cepa de *Heliothis virescens* resistente a Bt *kurstaki* HD-73, que las proteasas intestinales degradaban con mayor rapidez la toxina activa que las proteasas de la cepa susceptible. Igualmente, la intensa actividad proteolítica del jugo intestinal de *Heliothis armigera* (Shao *et al.*, 1998) y *Choristoneura fumiferana* (Pang *et al.*, 1999) contribuyó a la degradación de las toxinas activadas en ambos insectos, volviéndolos menos susceptibles a Bt que *Bombyx mori*, en el que las toxinas activadas permanecieron sin degradar.

En un trabajo en el que se comparaban poblaciones de *L. decemlineata* resistentes y susceptibles a Cry3Aa, Loseva *et al.* (2002) encontraron que tanto en las BBMVs como en el jugo intestinal provenientes de ambas cepas estaban presentes varias actividades enzimáticas. El perfil de actividad enzimática de la cepa resistente resultó diferente al de la cepa susceptible, puesto que la cepa resistente poseía tipos de proteasas diferentes con elevada actividad. Estos autores sugirieron que la aparición de nuevas proteasas en la cepa resistente de *L. decemlineata* podría ser el resultado de una expresión génica específica en respuesta a la exposición a la toxina Cry3Aa, aunque no encontrasen diferencias en el procesado de la toxina por el jugo de intestinal o las BBMVs de las cepas resistente y susceptible (Loseva *et al.*, 2002).

Si bien el papel de las proteasas digestivas solubles en la activación o degradación de las toxinas Cry ha sido considerablemente estudiado, se conoce poco sobre la función de las proteasas asociadas a la membrana del intestino en el modo de acción de las toxinas Cry. En el citado trabajo de Loseva *et al.* (2002) se describe

que las BBMV de *L. decemlineata* generaron un fragmento de Cry3Aa de 38 kDa resistente a la proteólisis. Igualmente, Dai y Gill (1993) describieron que la incubación de la toxina Cry11Aa, activa contra dípteros, con BBMV de *Culex quinquefasciatus* originó un patrón de proteólisis específico. En ninguno de estos trabajos se profundizó en el significado funcional de dicho proceso proteolítico asociado a la membrana.

- Unión al receptor

La unión de las toxinas Cry a sus receptores en las células del epitelio intestinal del insecto diana es un evento determinante en su especificidad. Para algunas toxinas Cry se han relacionado alteraciones en los sitios de unión a la membrana con la aparición de resistencia (Ferré y Van Rie, 2002). Entre las proteínas identificadas como posibles receptores o como receptores funcionales de las toxinas Cry de Bt se encuentran la proteína integral de membrana caderina y las proteínas aminopeptidasa N (APN) y fosfatasa alcalina (ALP), estas dos últimas ancladas a la membrana por un residuo de glicosil fosfatidil inositol (GPI) (revisado en Pigott y Ellar, 2007). En nemátodos se ha descrito que los receptores para la toxina Cry5Ba son glicolípidos y existen evidencias experimentales que indican que los glicolípidos también podrían ser receptores para las toxinas Cry en insectos (Griffitts *et al.*, 2005).

Las caderinas constituyen una familia de proteínas muy diversa que están implicadas en diferentes funciones tales como la adhesión celular, la organización del citoesqueleto y la morfogénesis (revisado en Pigott y Ellar, 2007). Las caderinas identificadas en insectos como receptores de las toxinas Cry de Bt son proteínas de membrana modulares que cuentan en su estructura con 11 ó 12 dominios de unión a calcio, también denominados repeticiones de caderina (CR), un dominio transmembrana y un dominio intracelular (Vadlamudi *et al.*, 1995). En las larvas de lepidópteros se ha observado que estas proteínas se localizan en la membrana apical de las células columnares del epitelio intestinal, la cual constituye el sitio diana de las tóxicas Cry de Bt (revisado en Pigott y Ellar, 2007).

Se han identificado caderinas como receptores funcionales para varias toxinas Cry de Bt fundamentalmente en insectos lepidópteros como *Manduca sexta*

(Vadlamudi *et al.*, 1993; 1995), *Bombyx mori* (Nagatsamu *et al.*, 1998a, 1998b), *Heliothis virescens* (Gahan *et al.*, 2001) y *Ostrinia nubilalis* (Flannagan *et al.*, 2005). Recientemente se ha identificado una caderina como receptor funcional de la toxina Cry3Aa en el coleóptero *Tenebrio molitor* (Fabrick *et al.*, 2009). Asimismo se han encontrado caderinas que unen toxinas Cry y que podrían estar relacionadas con su toxicidad en otros lepidópteros, como *Helicoverpa armigera* (Xu *et al.*, 2005) y *Pectinophora gossypiella* (Morin *et al.*, 2003), en el díptero *Anopheles gambiae* (Hua *et al.*, 2008) y en el coléoptero *D. virgifera virgifera* (Sayed *et al.*, 2007).

Park *et al.* (2009) describieron que la mezcla de un péptido que contenía las repeticiones CR8, CR9 y CR10 de la caderina de *D. virgifera virgifera* (Sayed *et al.*, 2007) con las toxinas Cry3Aa y Cry3Bb quimotripsinizadas produjo un aumento significativo en la toxicidad de cada una de estas proteínas en larvas de primer estadio de *L. decemlineata*. Estos autores han sugerido que al igual que en otros insectos, la caderina podría estar implicada en el modo de acción de las toxinas Cry3 en *L. decemlineata*.

Las aminopeptidasas N (APN) son endoproteasas que catalizan la liberación de aminoácidos neutros de los extremos N-terminal de polipéptidos. En el intestino de las larvas de lepidópteros están implicadas en la digestión de proteínas presentes en la dieta de los insectos, junto a otras endopeptidasas y carboxipeptidasas (Wang *et al.*, 2005). Son metaloproteasas dependientes de zinc pertenecientes a la familia M1 (Rawlings *et al.*, 2010) o a la subfamilia de las gluzincinas (Hooper, 1994). Las APN poseen la secuencia altamente conservada HEXXH en el sitio activo. A pesar de interactuar con toxinas Cry de Bt, no se ha descrito que las proteolice.

Se han identificado aminopeptidasas como receptores para las toxinas Cry en varios insectos lepidópteros como *M. sexta* (Knight *et al.*, 1995), *H. virescens* (Gill *et al.*, 1995; Oltean *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 1997; Banks *et al.*, 2003), *Spodoptera litura* (Agrawal *et al.*, 2002), *H. armigera* (Rajangopal *et al.*, 2003), *B. mori* (Yaoi *et al.*, 1999), *Lymantria dispar* (Garner *et al.*, 1999), *Plutella xylostella* (Nakanishi *et al.*, 2002) y en el díptero *Anopheles quadrimaculatus* (Abdullah *et al.*, 2006). El análisis filogenético de las APN de lepidópteros ha permitido dividir las APN en cinco clases diferentes, de las cuales al menos tres han mostrado unión a las toxinas

Cry1A (Herrero *et al.*, 2005; Pigott y Ellar, 2007). De manera general, las APN de lepidópteros son proteínas glicosiladas y ancladas a la membrana por un residuo de glicosil fosfatidil inositol (GPI). En muchos casos la glicosilación resulta determinante para la interacción entre las proteínas Cry y las APN, tal y como sucede en la interacción entre la toxina Cry1Ac y el receptor APN en *M. sexta* (Knight *et al.*, 2004).

Las APN son las enzimas más abundantes en las membranas de las microvellosidades intestinales en la mayoría de los insectos, llegando a constituir el 55% de las proteínas de la membrana del borde en cepillo del epitelio intestinal en coleópteros (Cristofolletti y Terra, 2000). No obstante, en este orden de insectos no se ha descrito APN alguna como receptor de las toxinas Cry de Bt. Resulta interesante señalar que Loseva *et al.* (2002) describieron la presencia de una elevada actividad aminopeptidasa N en una cepa de *L. decemlineata* resistente a la toxina Cry3Aa, en comparación con la actividad de la cepa susceptible.

Las fosfatasas alcalinas (ALP) también son proteínas ancladas a la membrana por un residuo de GPI. Han sido descritas como receptores para las toxinas Cry de Bt en los lepidópteros *M. sexta* (McNall y Adang, 2003), *H. virescens* (Jurat-Fuentes y Adang, 2004) y en el díptero *Aedes aegypti* (Fernández *et al.*, 2006). En el coleóptero *Anthonomus grandis* se han encontrado dos proteínas de 62 y 65 kDa con actividad de tipo fosfatasa alcalina a las que se unió la toxina Cry1Ba6 (Martins *et al.*, 2010).

Las proteínas ancladas a la membrana a través de GPI, tales como la APN y la ALP, se localizan preferentemente en microdominios lipídicos denominados *lipid rafts* (Brown y Rose, 1992), que son regiones de la membrana plasmática enriquecidas en colesterol y esfingolípidos que segregan y concentran proteínas en el plano de la bicapa lipídica (Simons e Ikonen, 1997). Desde el punto de vista bioquímico, estos dominios se caracterizan por su insolubilidad en detergentes no iónicos a bajas temperaturas y por su presencia en fracciones de membrana de baja densidad tras la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (Brown, 2006).

Los *lipid rafts* están involucrados en procesos celulares de gran relevancia, como la transducción de señales (Simons y Toomre, 2000), y se ha descrito que constituyen

el portal de entrada a las células para algunas toxinas bacterianas como la toxina del cólera y la toxina del tétanos (TeNT) (Wolf *et al.*, 1998; Herreros *et al.*, 2001).

En los insectos *H. virescens* y *M. sexta* se ha demostrado que la integridad de los *lipid rafts* presentes en sus BBMV resultó esencial para la formación de poro *in vitro* de la toxina Cry1Ab (Zhuang *et al.*, 2002). En dicho trabajo igualmente se observó que las APN de las larvas de ambos insectos se localizaron fundamentalmente en los *lipid rafts*, regiones en las que también se detectó la asociación de las toxinas Cry1A. Estos autores sugirieron que la interacción de las toxinas Cry1A con las regiones de la membrana del epitelio intestinal ricas en colesterol podría ser un evento clave en el mecanismo de acción de estas proteínas en *H. virescens* y *M. sexta* (Zhuang *et al.*, 2002). Aunque en las microvellosidades intestinales de los coleópteros el contenido de colesterol es de 5 a 6,5 veces superior al de los lepidópteros (Terra *et al.*, 2006), hasta el momento la interacción de las toxinas Cry activas contra coleópteros con los *lipid rafts* de estos insectos no se ha estudiado.

3.4- Modelos que explican el mecanismo de toxicidad

A continuación se incluyen los modelos que intentan explicar los mecanismos a través de los cuales las toxinas Cry, tras su unión a receptores de membrana, desencadenan su acción tóxica.

- Modelo de formación de poro (Modelo de Bravo)

El modelo de formación de poro formulado por Bravo y colaboradores está basado fundamentalmente en estudios realizados con la toxina Cry1Ab y BBMV de *M. sexta*. En este modelo se propone que la toxina Cry1Ab activada y en estructura monomérica se une al receptor primario caderina o Bt-R1, lo cual produce un cambio conformacional en la toxina que facilita el corte de la hélice α -1 por proteasas unidas a la membrana (Gómez *et al.*, 2002). Dicho corte proteolítico facilita la oligomerización de la toxina, la cual forma un tetrámero pre-poro (Gómez *et al.*, 2002) que se une con mayor afinidad al receptor secundario APN o ALP, anclados a la membrana a través de GPI y localizados en los *lipid rafts*

(Bravo *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2007). La unión al receptor secundario dirige el oligómero pre-poro hacia los *lipid rafts* de la membrana apical de las células columnares donde se inserta y forma poros líticos (Figura 5A). Se pueden llegar a formar alrededor de 200 copias de poros líticos con un radio de 0,5 a 1,0 nm, lo cual genera cambios muy rápidos en el potencial de membrana, produce el equilibrio de iones a ambos lados de la membrana, la entrada de agua, la hinchazón de las células y la lisis celular (Knowles y Dow, 1993).

Aunque inicialmente el modelo de Bravo proponía que la interacción con ambos tipos de receptores tenía lugar de manera secuencial (Bravo *et al.*, 2004), recientemente este grupo de investigadores ha postulado que la interacción con el receptor caderina y los receptores anclados al GPI tiene lugar a través de un mecanismo de *ping-pong* (Pacheco *et al.*, 2009). Ensayos de mutagénesis llevados a cabo en los lazos 2 y 3 del dominio II de Cry1Ab han mostrado que los receptores APN y ALP anclados a la membrana a través de un residuo GPI cumplen dos funciones en el modo de acción de la toxina Cry1Ab en *M. sexta*. Inicialmente funcionan como sitios de unión altamente abundantes y de baja afinidad que localizan y concentran el monómero de la toxina en la vecindad de las microvellosidades, antes de la interacción con el receptor caderina, y finalmente como receptores secundarios de elevada afinidad que median la inserción del oligómero de Cry1Ab en la membrana (Pacheco *et al.*, 2009; Arenas *et al.*, 2010).

Numerosas evidencias experimentales sustentan el modelo propuesto por Bravo *et al.* (2004), entre ellas la más relevante la constituye la producción de una toxina Cry1 modificada (Cry1mod) que carecía de la hélice α -1 del dominio I. La proteína Cry1mod resultó tóxica para insectos resistentes a las toxinas Cry que poseían una mutación en el gen del receptor caderina o que eran poco susceptibles a las toxinas porque se había silenciado el gen de la caderina con RNA de interferencia (Soberón *et al.*, 2007).

- **Modelo de transducción de la señal (Modelo de Zhang)**

Este modelo cuestiona que la toxicidad generada por las toxinas Cry se deba exclusivamente a la lisis osmótica, así como que estén implicados la oligomerización de la toxina Cry1Ab y otros receptores diferentes al receptor

caderina en el mecanismo de acción tóxica. Está basado en el análisis de los efectos producidos por la toxina Cry1Ab en un cultivo de células de *Trichoplusia ni* que expresaban el receptor Bt-R₁ de *M. sexta* (Zhang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006).

Propone que la unión del monómero de la toxina Cry1Ab al receptor caderina o Bt-R₁ inicia una ruta de señalización dependiente de iones Mg²⁺ que causa la muerte celular por oncosis. La unión al receptor caderina activa una ruta de señalización que involucra la estimulación de una proteína G y de una proteína adenilato ciclasa, el aumento de los niveles de AMP cíclico y la activación de una proteína quinasa A (Figura 5B), todo lo cual provoca una serie de cambios en la fisiología celular que incluyen la desestabilización del citoesqueleto y del flujo de iones que culminan en la muerte celular por oncosis (Zhang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Este grupo de autores también ha sugerido que la cascada de señalización que tiene lugar en el interior celular es responsable de la exocitosis de receptores Bt-R₁ desde el interior de la célula hacia la membrana, lo cual produce una amplificación de la señal tóxica (Zhang *et al.*, 2008).

- Modelo de Jurat-Fuentes

Otros autores han sugerido que la toxicidad de Cry1Ac en *H. virescens* podría deberse a una combinación de los efectos de la lisis osmótica y la señalización celular (Jurat-Fuentes y Adang, 2006). Según estos autores, la toxina monomérica activada se une al receptor tipo caderina HevCaLP y dicha unión produce la activación de una ruta de señalización intracelular que podría involucrar fosfatasas (Jurat-Fuentes y Adang, 2006) o podría depender de la interacción directa entre Cry1Ac y actina (Jurat-Fuentes y Adang, 2006; McNall y Adang, 2003). Tras la unión a HevCaLP, el monómero de toxina oligomeriza y se une a proteínas ancladas a GPI y localizadas en los *lipid rafts* como APN y ALP (HvALP) (Jurat-Fuentes y Adang, 2004). Cualquiera de estas proteínas podría dirigir el oligómero hacia los *lipid rafts*, donde la formación de poros conduciría al choque osmótico y a la activación de cascadas de transducción de señales que producirían la muerte celular.

Considerando que en otras toxinas bacterianas formadoras de poros, como la α -toxina de *Staphylococcus aureus* y la aerolisina de *Aeromonas hydrophila*, la

toxicidad generada puede deberse tanto a la formación de poros como a rutas de señalización celular que producen apoptosis (Menzies y Kourteva, 2000; Nelson *et al.*, 1999), cabe sugerir que en el modo de acción de las toxinas Cry de Bt podría ocurrir algo similar, de manera que la unión de la toxina a la membrana del epitelio intestinal del insecto diana, además de provocar la oligomerización de la toxina con la consiguiente inserción y formación de poros, también podría desencadenar rutas de señalización celular que estuviesen implicadas en la toxicidad.

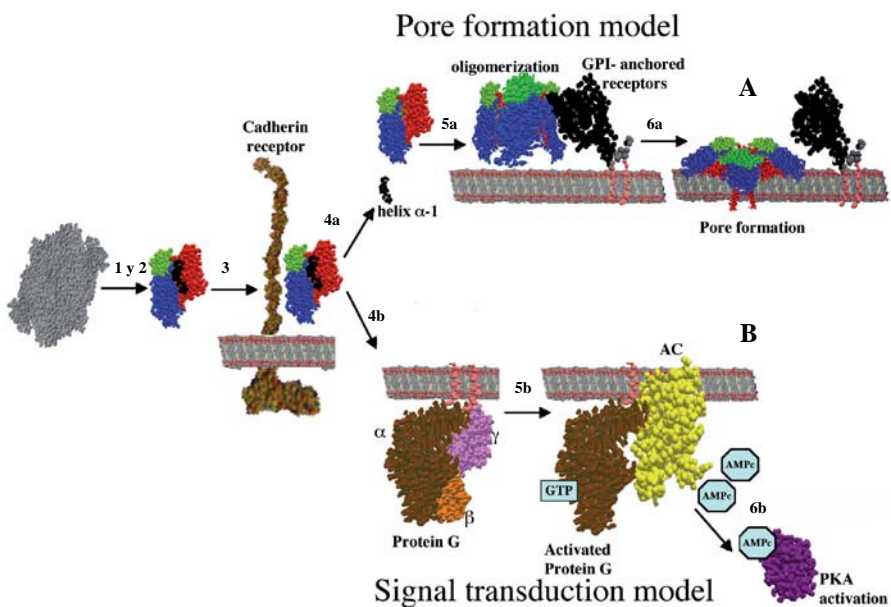


Figura 5.- Mecanismo de acción de las toxinas Cry

A) Modelo de Formación de Poro (Modelo de Bravo). B) Modelo de Transducción de la señal (Modelo de Zhang). Las etapas de solubilización del cristal (1), activación proteolítica (2) y unión al receptor caderina (3) son comunes para ambos modelos. Seguidamente, en el modelo de formación de poro tiene lugar el corte de la hélice α -1 (4a), la oligomerización de la toxina, la interacción del oligómero con los receptores anclados a GPI (5a) y la formación de poros que están implicados en la muerte celular (6a). En el modelo de transducción de la señal la unión al receptor caderina produce la activación de una proteína G (4b), que activa una proteína adenilato ciclasa (AC) (5b), aumentando los niveles de AMP cíclico (AMPc) lo cual activa una proteína quinasa A (PKA) que está implicada en la activación de una ruta intracelular que produce la muerte celular (6b). Tomado de Soberón *et al.*, 2009.

Objetivos

Objetivos

Leptinotarsa decemlineata es un insecto plaga de gran importancia económica a nivel mundial que ha demostrado una elevada capacidad para desarrollar resistencia a insecticidas. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* constituyen una herramienta de gran valor para el control de esta plaga, sin provocar efectos perjudiciales sobre el medio ambiente. Sin embargo, se requiere un conocimiento detallado de su mecanismo de acción y especificidad, para abordar los problemas potenciales que pueden comprometer su uso y eficacia, como son el espectro insecticida o la aparición de resistencia. En el presente trabajo nos proponemos profundizar en el estudio del modo de acción de la toxina Cry3Aa en *L. decemlineata*, centrándonos en los eventos que tienen lugar como consecuencia de su interacción con la membrana del epitelio intestinal, en los que puedan estar implicados mecanismos de reconocimiento, proteólisis catalizada por proteasas de membrana, formación de poros y toxicidad. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1- Caracterización de la proteólisis de la toxina Cry3Aa catalizada por proteasas asociadas a la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata*.
- 2- Estudio de la interacción de la toxina Cry3Aa con proteínas de microdominios de la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata*.
- 3- Análisis del significado funcional de la interacción de la toxina Cry3Aa con la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata*.

Material y Métodos

Material y Métodos

1- Material biológico utilizado

1.1- *Leptinotarsa decemlineata*

La colonia de *L. decemlineata* se estableció en el laboratorio a partir de adultos directamente recogidos de plantas de patata cultivadas en diversas zonas de la Comunidad Valenciana, que nunca habían estado en contacto con insecticidas basados en las toxinas de Bt.

Las larvas y adultos se alimentaron con hojas frescas de patata. Se mantuvieron en una cámara termoregulada a una temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa del 60-70% y un fotoperiodo de luz:oscuridad de 16:8 h.

1.2- Cepa de *Bacillus thuringiensis*

Se utilizó la cepa de *B. thuringiensis* BTS1 (Rausell *et al.*, 2004) para la producción de la toxina Cry3Aa. El crecimiento de la cepa BTS1, productora de la toxina Cry3Aa, se llevó a cabo en una placa Petri con medio de cultivo LB agar, a 30°C , durante un mínimo de 12 h, hasta obtener crecimiento confluyente. El cultivo (una cuarta parte de la placa) se inoculó en 200 mL de medio CCY (Stewart *et al.*, 1981), manteniéndose a 30°C en agitación a 200 rpm en un agitador orbital (IKA Labortechnik), hasta su completa esporulación y producción de cristales, lo cual se comprobó mediante la observación al microscopio óptico de contraste de fases de una alícuota del cultivo líquido tomada en condiciones estériles.

2- Preparación de las BBMV de *L. decemlineata*

Las vesículas de membrana del borde en cepillo (BBMV, según sus siglas en inglés) del epitelio intestinal de *L. decemlineata* se prepararon según el método de Wolfesberger *et al.* (1987), modificado por Reuveni y Dunn (1991). Para la obtención de los intestinos se diseccionaron larvas de cuarto estadio de desarrollo, mantenidas en ayuno durante un período de 2 h e inmovilizadas en hielo durante 10 min. Una vez extraídos los intestinos se eliminó su contenido y la membrana peritrófica, los epitelios se lavaron en tampón de almacenamiento (manitol 300 mM, 2-mercaptoetanol 20 mM, EGTA 5 mM, EDTA 1 mM, HEPES 10 mM, Tris-HCl 17 mM, pH 7,5) y se congelaron a -80°C hasta su uso.

Para la preparación de las BBMV, los intestinos congelados se homogeneizaron mecánicamente en 5 volúmenes de tampón de homogeneización: manitol 200 mM, ácido ascórbico 10 mM, EGTA 5 mM, DTT 2 mM, HEPES 10 mM, MES 10 mM, pH 7,4 (ajustado con bis-tris propano 0,5 M) en hielo y se añadió el mismo volumen de MgCl_2 24mM. La mezcla se mantuvo en hielo 10 min y se centrifugó a $6.000 \times g$ durante 10 min a 4°C . El sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar a $30.000 \times g$ durante 30 min a 4°C . El sedimento resultante se resuspendió en manitol 200 mM, DTT 1 mM, Hepes-Tris 1 mM, pH 7,4 y se repartió en alícuotas que fueron guardadas a -80°C hasta su utilización. La concentración de proteínas de las vesículas se determinó por el método de Bradford (1976).

Para evaluar la calidad de las BBMV preparadas se ensayó la actividad de la enzima aminopeptidasa N. Para ello, se mezclaron en una cubeta 50 μg de BBMV con una solución que contenía Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0, NaCl 0,25 M y el sustrato leucina-p-nitroanilida (Sigma) 1 mM, en un volumen final de 1 mL completado con agua. El aumento de la absorbancia a 405 nm se monitorizó cada 15 segundos, a temperatura ambiente, en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 5.

3- Aislamiento de células del epitelio intestinal de *L. decemlineata*

Se obtuvieron intestinos de larvas de segundo estadio de *L. decemlineata*, se abrieron longitudinalmente, se colocaron en una placa Petri que contenía 4 mL de tampón PBS (Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 2 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), y se agitaron a 200 rpm en un agitador orbital (IKA Labortechnik) durante 1 h a temperatura ambiente. Tras retirar los fragmentos de tejido intacto, las células disociadas se recuperaron en el sedimento resultante de la centrifugación a $470 \times g$ durante 3 min. Los experimentos se llevaron a cabo empleando intestinos de 20 larvas de segundo estadio que de manera consistente originaron $1,6 (\pm 0,1) \times 10^8$ células disociadas.

4- Separación de fracciones de membrana de MECs de *L. decemlineata*

Las células del epitelio intestinal de 20 larvas de *L. decemlineata* de segundo estadio se disociaron según se describe en el apartado anterior. Tras la centrifugación, el sedimento se resuspendió en 50 μL de tampón de lisis frío (Tris 100 mM, NaCl 150 mM, EGTA 0,2 mM, PMSF 1 mM, 1 tableta de Complete Mini (Roche), Tritón X-100 1% (v/v), pH 7,5). La mezcla se incubó durante 30 min en hielo, se homogeneizó mecánicamente y se transfirió a un tubo de centrifuga Ultra-Clear (Beckman) en el que se mezcló con un volumen equivalente de una solución de sacarosa 85% (p/v) en tampón TNE (NaCl 150 mM, EGTA 0,2 mM, Tris 100 mM, pH 7,5). La mezcla se cubrió con 3,5 mL de una solución de sacarosa 35% (p/v) y a continuación 1 mL de sacarosa 5% (p/v), ambas en tampón TNE, pH 7,5. La muestra se centrifugó a $200.000 \times g$ en una ultracentrífuga Beckman equipada con un rotor basculante SW55 Ti, durante 18 h a 4°C . Tras la centrifugación se recogieron 6 fracciones de 200 μL cada una, comenzando por la parte superior del gradiente hasta el fondo del tubo de centrifuga.

Las proteínas contenidas en las fracciones recogidas se separaron por SDS-PAGE (10 %) y se tiñeron con azul de Coomassie, según se describe en el apartado 9 o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (apartado 12).

A partir del gel teñido con azul de Coomassie se seleccionaron y cortaron bandas de proteínas y se enviaron al Servicio de Proteómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia) para su análisis por espectrometría de masas.

5- Obtención de la proteína Cry3Aa

El cultivo esporulado de la cepa de Bt BTS1 se centrifugó a $15.344 \times g$ a 4°C durante 10 min. El sedimento resultante se lavó tres veces con 30 mL de tampón TET (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 0,05% (v/v), pH 7,5) centrifugando en cada ocasión durante 10 min a $15.344 \times g$ a 4°C . El sedimento final se resuspendió en 5 mL de tampón TTN (Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, Tritón X-100 0,1% (v/v), pH 7,2) y se sonicó tres veces con un pulso de 50 s a 20 W, con intervalos de descanso de 1 min en hielo entre cada sonicación. El volumen de la muestra se completó hasta 12 mL con TTN.

5.1- Purificación de cristales

Los cristales de Cry3Aa se purificaron en un gradiente discontinuo de soluciones de sacarosa de concentraciones de 67, 72, 79 y 84% (p/v) en una solución de Tris 50 mM pH 8,0, Tritón X-100 0,01% (v/v), NaCl 10 mM, según el procedimiento descrito por Thomas y Ellar (1983). Para formar el gradiente se depositaron 6 mL de cada solución de sacarosa en el tubo de centrifuga, comenzando por la de mayor concentración. Sobre la parte superior del gradiente se añadieron 2 mL de la muestra, preparada según se describe en el apartado anterior y se ultracentrifugó a $100.000 \times g$ durante 20 min, a 15°C , en una ultracentrífuga Beckman equipada con un rotor basculante SW28.

Tras la ultracentrifugación se recogieron las fracciones del gradiente por aspiración con pipeta, comenzando por la parte superior del tubo y se observó una alícuota de cada una de ellas al microscopio óptico de contraste de fases. En las dos fracciones localizadas entre las posiciones del gradiente de 79 y 72% de sacarosa se detectó la presencia mayoritaria de cristales y la ausencia de esporas o células vegetativas.

Estas fracciones se lavaron con agua, llenando los tubos de centrifuga hasta su máxima capacidad y a continuación se realizaron otros tres lavados con 20 mL de tampón TET, centrifugando a 15.344 x g, durante 10 min, a 4°C. Los cristales contenidos en los sedimentos finales se solubilizaron, según se describe en el apartado 5.2 ó se resuspendieron en agua y se mantuvieron a -20°C hasta su utilización.

5.2- Solubilización de cristales de Cry3Aa

La solubilización de la toxina se llevó a cabo incubando los cristales con una solución de Na₂CO₃ 50 mM, pH 10,5, durante 12 h a 37°C, en agitación. Tras la incubación la muestra se centrifugó a 4°C a 10.600 x g, durante 10 min. La proteína contenida en el sobrenadante se cuantificó por el método de Bradford (1976) utilizando BSA como estándar. Para comprobar la pureza e integridad de la toxina, el solubilizado se sometió a análisis por SDS-PAGE (10%), según se describe en el apartado 9.

6- Marcaje de la toxina Cry3Aa con los fluoróforos Cy5 y Cy3

Previamente a la reacción de marcaje, la toxina solubilizada según se describe en el epígrafe 5.2 se precipitó utilizando el kit Plus One 2-D Clean-Up (GE Healthcare) y se resuspendió en tampón que contenía Tris-HCl 30 mM, pH 8,5, urea 7 M, tiourea 2 M y CHAPS 4% (p/v). La concentración de la proteína se determinó utilizando el kit RC-DC Protein Assay (Bio-Rad).

El marcaje mínimo de la toxina con los fluoróforos CyDye™ DIGE Cy5 y Cy3 (GE Healthcare) se llevó a cabo siguiendo las instrucciones de GE Healthcare. Se incubaron 50 µg de toxina con 400 pmol de cada fluoróforo, durante 30 min, en la oscuridad. Para detener la reacción se añadió 1 µL de lisina 10 mM y se incubó la mezcla durante 10 min en la oscuridad.

7- Procesado proteolítico de la toxina Cry3Aa

7.1- Procesado proteolítico de Cry3Aa por tripsina y quimotripsina

Previamente a la adición de las enzimas proteolíticas, el pH de la preparación de la toxina Cry3Aa solubilizada como se ha descrito en el apartado 5.2, se ajustó a 8,5 con tampón Tris-HCl 1 M, pH 8,0. La toxina se incubó con quimotripsina (1:2, p/p toxina/enzima) o tripsina (5:1, p/p toxina/enzima) durante 12 h a 37°C. Las reacciones se detuvieron añadiendo PMSF a una concentración final de 0,1 mM.

7.2- Procesado proteolítico de Cry3Aa por BBMV de *L. decemlineata*

El tampón de las BBMV, preparadas según se describe en el apartado 2, se cambió centrifugando 5 min a 20.817 x g a 4°C y resuspendiendo el sedimento resultante en tampón PBS. La proteólisis de la toxina catalizada por las BBMV se llevó a cabo mediante la incubación de Cry3Aa 2 µM con BBMV (20 µg de proteína total), durante 10 min, a temperatura ambiente, en un volumen total de 30 µL en PBS, pH 7,4 u 11,0. Transcurrido el período de incubación, la mezcla de reacción se centrifugó a 20.800 x g durante 20 min a 20°C, separándose así los fragmentos de proteólisis y la fracción soluble de Cry3Aa contenidos en el sobrenadante, de la toxina unida a las BBMV.

Para la proteólisis de la toxina Cry3Aa catalizada por las proteasas presentes en el sobrenadante de las BBMV, las BBMV (20 µg de proteína total) se centrifugaron durante 15 min a 20.817 x g a 4°C y el sobrenadante obtenido se incubó durante 10 min a temperatura ambiente con la toxina Cry3Aa 2µM en un volumen final de 30 µL, completado con tampón PBS.

En el caso de la proteólisis de la toxina Cry3Aa catalizada por BBMV en presencia de inhibidores de proteasas, péptidos, moduladores de la actividad proteolítica de metaloproteasas ADAM y calmodulina, se procedió de manera similar a cómo se describe en el párrafo anterior, con la excepción de que como paso previo a la adición de la toxina, las BBMV se incubaron con dichos compuestos en las condiciones que se especifican a continuación.

- Proteólisis de Cry3Aa en presencia de inhibidores de proteasas

Las BBMV se pusieron en contacto durante 5 min, en hielo, con los inhibidores de proteasas, en mezclas o por separado, a las concentraciones finales recomendadas por el fabricante (Sigma) o que se especifican: PMSF 1 mM, E-64 10 μ M, leupeptina 100 μ M, amastatina 0,1 mM (Robertson *et al.*, 1992), EDTA 10 mM, 1,10-fenantrolina 3, 10 y 20 mM, TPCK 0,1 mM, pepstatina A 50 μ M, Pefabloc 5 mM (Hahm *et al.*, 1995), inhibidor de tripsina de soja 0,1 mg/mL (Birk y Applebaum, 1960), ácido acetohidroxámico 100 μ M (se probaron concentraciones de 25, 50 y 100 mM)

- Proteólisis de Cry3Aa en presencia del péptido pep-99

El péptido pep-99 (Ac-FTLSLDGAPFNQ-NH₂), disuelto en tampón PBS pH 7,4, se incubó con las vesículas durante 5 min en hielo a las concentraciones finales de 1, 2 y 7 mM.

- Proteólisis de Cry3Aa en presencia del péptido pep-rec

Las BBMV se incubaron con el péptido pep-rec (Ac-FHTRFQPGYYGNDSFN-NH₂) disuelto en DMSO o con 1 μ L de DMSO, como control, durante 5 min en hielo. Las concentraciones finales de péptido en el ensayo fueron de 1 y 2 mM.

- Proteólisis de Cry3Aa en presencia de moduladores de la actividad proteolítica de metaloproteasas ADAM

Para analizar la influencia en la proteólisis de Cry3Aa catalizada por BBMV de compuestos descritos como moduladores de la actividad proteolítica de metaloproteasas ADAM, las BBMV se incubaron con trifluoperazina (TFP), 2-metil-ciclodextrina (MCD), el éster de forbol 12-miristato-13-acetato forbol (PMA), 4-amino-metil-mercúrico acetato (APMA), A2317 o ionomicina durante 30 min a temperatura ambiente. Las concentraciones finales de cada compuesto fueron: TFP 100 μ M; MCD 2,5, 5 y 10 mM; PMA 10 μ M; APMA 100 μ M, A2317 5 μ M e ionomicina 5 μ M.

- Proteólisis en presencia de calmodulina

Se incubaron las BBMV con calmodulina (Calmodulin from Bovine Testes, Sigma) a temperatura ambiente durante 2 h a una concentración final de 25 U/ μ L.

7.3- Ensayos de proteólisis de Cry3Aa catalizada por fracciones de membrana obtenidas a partir de MECs

Se incubó la toxina a una concentración final de 2 μ M con 25 μ L de las fracciones de MECs recogidas del gradiente de sacarosa (apartado 4), durante 10 min a temperatura ambiente, en un volumen final de 30 μ L completado con tampón TNE, pH 7,5. Tras las incubaciones, las muestras se centrifugaron a 20.800 x g, durante 20 min, a 20°C y las proteínas de los sobrenadantes se analizaron por SDS-PAGE (10%). Los fragmentos de proteólisis se inmunodetectaron empleando el anticuerpo anti-Cry3A, tal y como se describe en el apartado 13.

Los ensayos de proteólisis en presencia de los inhibidores 1,10-fenantrolina y E64 se llevaron a cabo del mismo modo, a las concentraciones finales de 10 mM y 10 μ M, respectivamente. Previamente a la incubación con la toxina, las fracciones de MECs se pusieron en contacto con los inhibidores durante 5 min, a temperatura ambiente.

8- Ensayos de proteólisis de sustratos sintéticos de proteasas catalizados por BBMV de *L. decemlineata*

- Proteólisis del péptido fluorogénico sustrato de metaloproteasas tipo ADAM

Para ensayar la presencia de actividad metaloproteasa tipo ADAM en las BBMV o en las fracciones eluidas de la matriz con pep-rec inmovilizado (apartado 22), se empleó el péptido sintético fluorescente sustrato de ADAM10 con la estructura Mca-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂ (BIOMOL International LP). En dicho péptido la fluorescencia del grupo Mca ([7-metoxicoumarina-4-yl] acetil) está internamente atenuada por la porción Dpa (3-[2,4-dinitrofenil]-L-2,3-diaminopropionil). El corte

proteolítico del péptido produce la separación de ambos grupos y el aumento de la fluorescencia.

Los ensayos de corte se llevaron a cabo tanto con el sobrenadante procedente de la centrifugación de 400 μL de BBMV (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a 20.817 x g durante 15 min a 4°C, como con el eluido procedente de la inmunoprecipitación con pep-rec inmovilizado, descrita en el apartado 22. Para la reacción se mezclaron 20 μL de sobrenadante de BBMV ó 50 μL del eluido de la matriz de pep-rec con 1 mL de tampón PBS pH 11,0 y a continuación se añadió 1 μL de la solución de sustrato (10 mM) (Amour *et al*, 2000). En los ensayos de corte con BBMV se utilizó Cry3Aa como competidor a una concentración final de 26,5 μM . El aumento de la fluorescencia se siguió durante 30 min a 25°C en un espectrofotómetro de Fluorescencia VARIAN Cary Eclipse equipado con un soporte de celda controlado termostáticamente. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 328 y 393 nm, respectivamente.

- Proteólisis de péptidos fluorogénicos sustratos de cisteín proteasas

Para analizar la presencia de cisteín proteasas en las BBMV de *L. decemlineata* se emplearon péptidos sintéticos fluorescentes (Sigma) como sustrato de cisteín proteasas de tipo papaína o catepsina L (Z-Phe-Arg-MCA) o de cisteín proteasas de tipo catepsina B (Z-Arg-Arg-MCA).

En el ensayo de proteólisis del péptido Z-Phe-Arg-MCA en condiciones que favorecían la actividad de cisteín proteasas de tipo papaína se mezcló el sustrato a una concentración final de 20 μM con 1 mL de tampón que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 y L-cisteína 10 mM recién preparada (Goulet *et al.*, 2008) y a continuación se adicionaron 25 μL de BBMV (75 μg de proteína totales). Para la proteólisis del péptido Z-Phe-Arg-MCA en condiciones que favorecían la actividad de cisteín proteasas de tipo catepsina L, el sustrato (20 μM , concentración final) se mezcló con 1 mL de tampón que contenía MES 50 mM, pH 5,5 y L-cisteína 10 mM recién preparada (Goulet *et al.*, 2008), y a continuación se adicionaron 25 μL de BBMV (75 μg de proteína totales). Los ensayos se llevaron a cabo a una

temperatura de 25°C. En ambos casos se utilizó la toxina Cry3Aa como competidor a una concentración final de 1,4 µM.

Para el ensayo de proteólisis del péptido Z-Arg-Arg-MCA, el sustrato (40 µM, concentración final) se mezcló con 1 mL de tampón que contenía MES 50 mM, pH 6,0 y L-cisteína 10 mM recién preparada (Goulet *et al.*, 2008), seguidamente se adicionaron 25 µL de BBMV (75 µg de proteína totales). La toxina Cry3Aa se utilizó como competidor a una concentración final de 2,2 µM.

En todos los ensayos, el aumento de la fluorescencia se visualizó durante 15 min, a 25°C para el sustrato Z-Phe-Arg-MCA y a 37°C para el sustrato Z-Arg-Arg-MCA, en un espectrofotómetro de Fluorescencia VARIAN Cary Eclipse equipado con un soporte de celda controlado termostáticamente. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 360 y 450 nm, respectivamente.

- Proteólisis de un péptido sintético sustrato de metaloproteasas de tipo astacina

El análisis de la presencia de metaloproteasas de tipo astacina en las BBMV de *L. decemlineata* se llevó a cabo mediante el empleo del péptido sintético Suc-Ala-Ala-Ala-pNA (Bachem). Se mezclaron 150 µL del péptido disuelto en tampón HEPES-NaOH 50 mM, pH 8,0 (1mM, concentración final) (Stöcker y Zwilling, 1995) con 150 µL de BBMV (450 µg de proteína total) y 2,1 mL de tampón HEPES-NaOH 50 mM, pH 8,0. La variación de la absorbancia se siguió a 405 nm durante 10 min, en un espectrofotómetro Agilent 8453E.

9- Separación por electroforesis en geles de poli(acrilamida) en condiciones desnaturalizantes

Las electroforesis en geles de poli(acrilamida) con SDS (SDS-PAGE) se llevaron a cabo según el procedimiento descrito por Laemmli (1970). Las muestras a analizar se mezclaron con un tampón compuesto por Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, SDS 4% (p/v), glicerol 20% (v/v), DTT 100 mM, azul de bromofenol 0,01% (p/v) y se calentaron durante 4 min a 95°C. Tras enfriar en hielo, las muestras se cargaron en

geles de poliacrilamida 10% (p/v). La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente a intensidad constante de 10 mA por gel. Se utilizaron marcadores de peso molecular coloreados de 250, 150, 100, 75, 37, 25, 20, 15 y 10 kDa (Presicion Plus Protein Standards, BIO-RAD). Para visualizar las proteínas, los geles se tiñeron con una solución compuesta por azul de Coomassie R-250 (Sigma) 0,3% (p/v), etanol 50% (v/v) y ácido acético 10% (v/v) y se destiñeron con una solución de etanol 7,5% (v/v) y ácido acético 5% (v/v).

10- Separación por electroforesis bidimensional de la fracción soluble resultante de la incubación de Cry3Aa con BBMV

Para conocer las regiones de Cry3Aa por las que tiene lugar la proteólisis, se incubaron 50 µg de Cry3Aa marcada con Cy5 con 250 µg de BBMV, en las condiciones descritas en el apartado 7.2. El sobrenadante procedente de la centrifugación se mezcló con otros 50 µg de toxina marcada con Cy3, sometida a un tratamiento similar al de la toxina marcada con Cy5, exceptuando la incubación con BBMV y dicha mezcla se analizó por electroforesis bidimensional. Paralelamente, se incubaron 350 µg de toxina sin marcar con BBMV, se separaron las proteínas por electroforesis bidimensional y se transfirieron a una membrana de PVDF para escindir los fragmentos de proteólisis y secuenciar los extremos N-terminal.

La mezcla de toxinas marcadas, así como el sobrenadante proveniente de la toxina sin marcar incubada con vesículas se precipitaron, por separado, utilizando el kit Plus One 2-D Clean-Up (GE Healthcare), seguidamente se resuspendieron en tampón que contenía Tris-HCl 30 mM, pH 8,5, urea 7 M, tiourea 2 M y CHAPS 4% (p/v) y se separaron en dos experiencias independientes, una para separar la mezcla de toxinas marcadas y la segunda para separar el sobrenadante procedente de la incubación de la toxina sin marcar con BBMV.

Para la primera dimensión, isoelectroenfoque, se utilizaron tiras ImmobilineTM Dry Strips (GE Healthcare) de 24 cm x 3 mm que contenían un gradiente no lineal de pH 3-10 inmovilizado. Las tiras se rehidrataron en una solución que contenía urea

7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2% (p/v), DTT 20 mM, *DeStreak* (GE Healthcare) 1,2% (v/v) y *Pharmalytes* 3-10 NL (GE Healthcare) 0,5% (v/v). Tras la rehidratación durante toda la noche, se cargaron la mezcla de Cry3Aa marcada con Cy3 o Cy5 en una tira y la toxina sin marcar preincubada con BBMV en otra, utilizando el método de *cup loading*. El isoelectroenfoque se llevó a cabo en gradiente de voltaje (300 V, 3 h; 1000 V, 6 h; 8000 V, 7 h; 500 V, 10 h), utilizando el sistema de isoelectroenfoque Ettan IPGPhor (GE Healthcare). Previamente a la segunda dimensión, las tiras se equilibraron durante 15 min en una solución que contenía Tris-HC 150 mM pH 8,6, urea 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), DTT 1% (p/v), seguida de otra incubación de 15 min con una solución similar a la anterior, que en lugar de DTT contenía iodoacetamida 2,5% (p/v).

Para la segunda dimensión se utilizaron geles de poliacrilamida 10% (p/v) con SDS, polimerizados usando cristales de baja fluorescencia. La electroforesis se llevó a cabo a una temperatura de 20°C, durante toda la noche, a potencia constante de 1 W por gel. Tras la separación, el gel con toxina marcada se escaneó en un escáner Typhoon 9400TM (GE Healthcare).

El gel con toxina sin marcar se electrotransfirió a una membrana de PVDF, según se describe en el apartado 12. La tinción de las proteínas transferidas se llevó a cabo incubando la membrana durante 2 min con una solución compuesta por azul de Coomassie R-250 (Sigma) 0,1% (p/v), metanol 50% (v/v) y ácido acético 7% (v/v). Seguidamente se incubó con una solución de metanol 50% (v/v) y ácido acético 7% (v/v) durante 10 min. Tras la tinción, se escindieron las bandas de interés y se enviaron al servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC (Madrid) para secuenciar el extremo N-terminal de los péptidos.

11- Separación por electroforesis bidimensional de proteínas de BBMV de *L. decemlineata*

Las BBMV (1,2 g de proteínas), preparadas según se describe en el apartado 2, se descongelaron en hielo y se centrifugaron durante 30 min a 4°C a 20.817 x g. La

fracción del sobrenadante correspondiente a 200 μg de proteínas de BBMV se separó por SDS-PAGE (epígrafe 9). El volumen restante (aproximadamente 1 g de proteínas) se dividió en dos y se analizó por electroforesis bidimensional, mediante dos experiencias independientes. Para ello, la muestra que contenía las BBMV se precipitó utilizando el kit Plus One 2-D Clean-Up (GE Healthcare), seguidamente se resuspendió en tampón que contenía Tris-HCl 30 mM, pH 8,5, urea 7 M, tiourea 2 M y CHAPS 4% (p/v) y se determinó la concentración de proteínas utilizando el kit RC-DC Protein Assay (Bio-Rad). El isoelectroenfoque se realizó en tiras Immobiline™ Dry Strips (GE Healthcare) de 7 cm x 3 mm con un gradiente no lineal de pH 3-10 inmovilizado. Tras la rehidratación durante toda la noche, tal y como se describe en el apartado 10, se cargaron 450 μg de proteína en cada tira, siguiendo el método de *cup loading*. El isoelectroenfoque se llevó a cabo a intensidad de la corriente de 50 μA por tira, a 20°C en siete etapas (500 V, 0,30 h; 1000 V, 0,30 h; gradiente 3000 V, 1,0 h; gradiente 5000 V, 1,0 h; 5000 V, 1,30 h; 500 V, 1:00 h), utilizando un sistema de isoelectroenfoque Ettan IPGPhor (GE Healthcare). Antes de la segunda dimensión las tiras se equilibraron tal y como se indica en el apartado 10. La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida 10% (p/v) con SDS, a intensidad constante de 10 mA por gel.

Seguidamente las proteínas se transfirieron, según se describe en el apartado 12, a membranas de PVDF. Una de las membranas que contenía las proteínas separadas por SDS-PAGE bidimensional y la que contenía las proteínas separadas por SDS-PAGE monodimensional se tiñeron con una solución de azul de Coomassie, según se indica en el apartado 10, de estas membranas se escindieron las bandas de interés y se enviaron al servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC, para la secuenciación de sus extremos N-terminal. La membrana restante, que contenía proteínas separadas por SDS-PAGE bidimensional, se empleó en la inmunodetección de la unión de Cry3Aa (apartado 13).

12- Electrotransferencia de proteínas

Para inmunodetectar la toxina Cry3Aa o las proteínas fasciclina y prohibitina, tras su separación por electroforesis, las proteínas de interés se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham) o PVDF (Roche) durante 1 h a intensidad constante de 250 mA, en una unidad de transferencia (BIO-RAD) en sistema líquido, utilizando un tampón compuesto por glicina 39 mM, Tris 48 mM, SDS 0,037% (p/v) y metanol 20% (v/v). La eficiencia de la transferencia se determinó tras la tinción de las proteínas en la membrana con Ponceau S (Sambrook *et al.*, 1987).

Previamente a la interacción con los anticuerpos o la toxina, se bloquearon las uniones inespecíficas a las membranas, para lo cual se incubaron durante toda la noche a 4°C, en agitación, con una solución de BSA 3% (p/v) (Sigma) en tampón PBS, pH 7,4 que contenía Tween 20 al 0,1% (v/v) (tampón PBST 0,1%).

13- Inmunodetección de proteínas

-Inmunodetección de la toxina Cry3Aa

La membrana de nitrocelulosa que contenía la toxina Cry3Aa inmovilizada se incubó durante 1 h con el anticuerpo policlonal anti-Cry3A generado en conejo (Polyten) (1:10.000 en PBST 0,1%). Seguidamente se eliminó el anticuerpo no unido mediante tres lavados de la membrana seguidos de un lavado de 5 min en agitación, primero con agua destilada y a continuación con tampón PBS, pH 7,4 que contenía Tween 20 2% (v/v) (tampón PBST 2%). Tras los lavados, la membrana se incubó durante 1 h con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo, conjugado a la fosfatasa alcalina (Sigma) (1:30.000 en PBST 0,1%). Se repitieron los lavados anteriormente indicados, añadiendo un lavado final de 10 min en agitación con tampón PBS, pH 7,4. Seguidamente se añadió el reactivo quimioluminiscente de la fosfatasa alcalina (Immobilon, Millipore) y se expuso una película fotográfica Amersham HyperfilmTM ECL (GE Healthcare) a la membrana.

- Inmunodetección de la unión de Cry3Aa

La membrana de nitrocelulosa o PVDF que contenía proteínas del epitelio intestinal de *L. decemlineata* se incubó durante una hora con una solución de la toxina Cry3Aa de concentración 75 nM en tampón PBS, pH 7,4. Seguidamente se llevaron a cabo los lavados de la membrana y la inmunodetección de la unión de Cry3Aa, tal y como se describe en el apartado anterior.

- Inmunodetección de las isoformas transmembrana y unida a GPI de fasciclina II

Las fracciones de membrana de MECs de *L. decemlineata* separadas en gradiente de sacarosa (apartado 4) se analizaron por SDS-PAGE, tal y como se describe en el epígrafe 9, exceptuando que el tampón de muestra utilizado no contenía DTT. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a dos membranas de nitrocelulosa (apartado 12) y se bloquearon las uniones inespecíficas durante 1 h a temperatura ambiente, con una solución de leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en TBS (NaCl 150 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 7,5) que contenía Tween 20 al 0,1% (v/v) (tampón TBST 0,1%). A continuación, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C, de manera independiente, con los anticuerpos generados en cobaya, anti-fasciclina transmembrana (anti-TM Fas II) y anti-fasciclina unida a GPI (anti-GPI Fas II) (amablemente cedidos por el Dr. Philip Copenhaver, Oregon Health and Science University) diluidos 1:2.000 y 1:5.000, respectivamente, en TBST 0,1%. Los anticuerpos no unidos se eliminaron lavando las membranas con agua y TBST 2% según se ha indicado en el párrafo que describe la inmunodetección de Cry3Aa. Tras los lavados cada membrana se incubó durante una hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-IgG de cobaya unido a la peroxidasa de rábano (Sigma), diluido 1:5.000 en TBST 0,1%. Seguidamente las membranas se lavaron, se incubaron con el reactivo quimioluminiscente de la peroxidasa de rábano (Pierce) y se expusieron a películas fotográficas Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare).

- Inmunodetección de la proteína prohibitina-1

Las fracciones insoluble (*rafts*) y soluble (*non-rafts*) en Tritón X-100 de MECs de *L. decemlineata* separadas en gradiente de sacarosa (apartado 4) se analizaron por

SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (apartado 12). Dicha membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo policlonal Prohibitin (H-80) (Santa Cruz) (1:200 en PBST 0,1%), generado contra el fragmento comprendido entre los aminoácidos 193 y 272 del extremo C-terminal de la prohibitina-1 humana. A continuación, el anticuerpo no unido se eliminó mediante tres lavados de la membrana, seguidos de un lavado de 5 min en agitación, primero con agua destilada y después con tampón PBS, pH 7,4, que contenía Tween 20 2% (v/v) (tampón PBST 2%). Seguidamente la membrana se incubó durante 1 h con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (Sigma) (1:30 000 en PBST 0,1%). Se repitieron los lavados previamente indicados, añadiendo un lavado final de 10 min en agitación con tampón PBS, pH 7,4. Finalmente se añadió el reactivo quimioluminiscente de la fosfatasa alcalina (Immobilon, Millipore) y la membrana se expuso a una película fotográfica Amersham HyperfilmTM ECL (GE Healthcare).

14- Aislamiento del gen de prohibitina-1 de *L. decemlineata*

14.1-Extracción de ARN total de intestinos de *L. decemlineata*

El ARN total se obtuvo a partir de intestinos de 10 larvas de *L. decemlineata* de cuarto estadio empleando el reactivo Trizol (Invitrogen) y siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración de ARN total y la integridad de la muestra (relación 28S/18S) se determinó utilizando el Bioanalizador Experion (Bio-Rad).

14.2-Síntesis de ADNc

El ADN complementario (ADNc) se obtuvo mediante la retrotranscripción de ARN extraído según se describe en el apartado 14.1. Para ello, se mezclaron 2 µg de ARN total con 4 µL de tampón de incubación 5X (Roche), 2 µL de una mezcla que contenía dATP 10 mM, dCTP 10 mM y dGTP 10 mM, 25 unidades de Protector RNase Inhibitor (Roche), 1 µg de cebador oligo (dT)₁₅ (Promega) y 40 unidades de transcriptasa reversa AMV (Roche), en un volumen final de 20 µL, completado

con agua. La mezcla de reacción se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, 1 hora a 43°C y 5 min a 94°C.

14.3-Amplificación por PCR del gen de prohibitina-1

Se diseñaron cebadores degenerados según la secuencia nucleotídica de los genes que codifican para las prohibitina-1 de insectos y de péptidos de proteínas del epitelio intestinal de *L. decemlineata*. Los oligonucleótidos se sintetizaron en *Integrated DNA Technologies* (Bélgica). La secuencia nucleotídica de los cebadores fue: SKDLQNVdirecto (5' AG(C/T) AA(A/G) GAT TTG CA(G/A) AAT GT 3'); ITLRILdirecto (5' AAC ATC AC(A/G) CT(G/C) CGT AT(T/C) CT 3'); VELKQVAreverso (5' GCC AC(C/T) TG(C/T) TTC ATT TC(C/G) AC 3'); IEAAEDIreverso (5' AT(A/G) TCC TCG GCG GC(T/C) TC 3').

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), mediante el programa que se describe a continuación: 1 ciclo (94°C, 2 min); 10 ciclos (94°C, 30 segundos; hibridación 50°C, 30 segundos; elongación 72°C, 2 min); 35 ciclos (94°C, 30 segundos; hibridación 50°C, 30 segundos; elongación 72°C, 2 min, añadiendo 5 segundos por ciclo a la elongación) y una elongación final de 72°C, 10 min. Se utilizó 1µL de ADNc, sintetizado según se describe en el apartado 14.2, 1,25 unidades de ADN polimerasa Paq5000TM (Stratagene), 2,5 µL de tampón de reacción 10X (Stratagene), 1mM de cada dNTP (Promega) y 2 µM de cebadores, en un volumen final de 25 µL, completado con agua.

15-Amplificación por PCR del gen de la metaloproteasa ADAM10 de *L. decemlineata*

Se diseñaron cebadores según la secuencia nucleotídica de regiones altamente conservadas en genes que codifican para metaloproteasas ADAM10 de *Drosophila melanogaster* y *Xenopus laevis*. Los oligonucleótidos se sintetizaron en *Integrated DNA Technologies* (Bélgica). La secuencia nucleotídica de los cebadores fue:

SPDFKLdirecto (5'GG(A/C/T) CT(A/G) AA(A/G) TTT (A/G)A(A/C/G/T) GT3'); GEEQ/CDCGreverso (5' GG(C/T) GT(C/T) AG(C/T) GT(A/G) A(G/C)(A/G) AG(A/C/G/T) GG3'); HEIGHdirecto (5' CAC GAA AT(C/T) GGA CA(C/T) 3'); HEIGHreverso (5' (A/G)TG TCC (A/G)AT TTC GTG 3'); HELGHdirecto (5' CAC GA(A/G) TTG GG(A/G/C) CAC 3'); HELGHreverso (5' GTG (G/C/T)CC CAA (C/T)TC GTG 3').

La reacción de PCR se llevó a cabo de manera similar a la descrita para la amplificación del gen de prohibitina-1 (apartado 14.3), con la excepción de que la temperatura de hibridación fue de 56°C.

16- Detección de proteínas de BBMV que interactúan con Cry3Aa utilizando el reactivo de entrecruzamiento Sulfo-SBED

Para identificar las proteínas de BBMV que interactúan con Cry3Aa se empleó el reactivo de entrecruzamiento trifuncional Sulfo-SBED que contiene en su estructura un éster activo de N-hidroxisuccinimida sulfonada (Sulfo-NHS), un residuo de aril azida fotoactivable y un residuo de biotina (ProFound™Sulfo-SBED Biotin Label Transfer Kit, Pierce). La biotilación de la toxina Cry3Aa así como la transferencia por fotoactivación de la marca de biotina a las proteínas de las BBMV con las que interactuó la toxina, se llevó a cabo en las condiciones sugeridas por el fabricante (Pierce). Las proteínas de interacción biotinizadas se detectaron por *Western blot* utilizando estreptavidina acoplada a la enzima peroxidasa de rábano. Las condiciones de las tres etapas en que se realizó este ensayo fueron las siguientes:

- Marcaje de Cry3Aa con Sulfo-SBED

El marcaje de la toxina se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (Pierce). Se preparó una solución de Cry3Aa de concentración 0,25 g/L en tampón PBS, pH 8,0. El reactivo Sulfo-SBED se disolvió a una concentración de 10 g/L en dimetil formamida. La reacción de marcaje se llevó a cabo incubando 50 µg de

Cry3Aa con 1,8 μg de Sulfo-SBED (relación molar 1:3), durante 30 min, a temperatura ambiente, en la oscuridad. La mezcla resultante se dializó durante toda la noche a 4°C empleando las unidades de diálisis y el tampón contenidos en el kit ProFound™ Sulfo-SBED Biotin Label Transfer (Pierce).

- Interacción de Cry3Aa-Sulfo-SBED con las proteínas de BBMV y reacción de entrecruzamiento

Se incubaron 5 μg de toxina marcada con Sulfo-SBED con 15 ó 30 μg de proteínas de BBMV durante 60 min en la oscuridad, a temperatura ambiente. Transcurrido este período se llevó a cabo la fotoactivación, para lo cual la muestra se colocó durante 5 min a una distancia de 5 cm de una lámpara ultravioleta de 75 W. Para ensayar la interacción de Cry3Aa marcada con Sulfo-SBED con proteínas de BBMV separadas por electroforesis bidimensional e inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa se procedió según se describe en el apartado 11 y tras la precipitación de la muestra de partida se recuperaron 1,5 mg de proteínas de BBMV. El volumen correspondiente a 0,5 mg se separó por electroforesis bidimensional (epígrafe 11) y a continuación las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (apartado 12). Las proteínas contenidas en el volumen restante fueron separadas por una segunda electroforesis bidimensional y el gel resultante se tiñó con una solución de Coomassie coloidal ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 8% (p/v), H_3PO_4 0,8% (v/v), azul de Coomassie G-2500, 08% (p/v), metanol 20% (v/v)), según el procedimiento indicado por GE Healthcare. La membrana con las proteínas de BBMV inmovilizadas se incubó con una solución de Cry3Aa marcada con Sulfo-SBED de concentración 75 nM en tampón PBS, pH 7,4, durante 1 h, a temperatura ambiente y en la oscuridad. Seguidamente, se eliminó la toxina marcada no unida y se lavó la membrana de manera análoga a como se describe en el apartado 13. A continuación se llevó a cabo la reacción de fotoactivación para lo cual la membrana se colocó durante 10 min bajo una lámpara ultravioleta de 8 W con una longitud de onda de emisión de 312 nm (BLX-312).

- Electrotransferencia

Tras las reacciones de fotoactivación se llevó a cabo la detección de las proteínas de BBMV marcadas con biotina. Con este fin, se separaron dos alícuotas de 20 μL

de la mezcla de Cry3Aa-Sulfo-SBED y las BBMV. A una de las cuales se le añadió 5 μL de tampón de muestra (Lane Marker Non-reducing Sample Buffer, Pierce) que contenía DTT 100 mM y a la segunda alícuota se le adicionó tampón de muestra sin DTT. Las muestras se calentaron a 70 °C, durante 5 min y se separaron por SDS-PAGE (apartado 9). Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (apartado 12). Dicha membrana, así como la que contenía las proteínas de BBMV inmovilizadas y que había estado en contacto con Cry3Aa marcada con Sulfo-SBED, se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con una solución de BSA 3% (p/v) en PBST 0,1%, para bloquear las uniones inespecíficas. Seguidamente, las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con una solución de estreptavidina unida a la peroxidasa de rábano 20 ng/mL en PBS pH 7,4. A continuación, se añadió el reactivo quimioluminiscente de la peroxidasa de rábano (Pierce) y se expusieron a películas fotográficas Amersham HyperfilmTM ECL (GE Healthcare).

Las manchas correspondientes a las proteínas de interés se seleccionaron comparando visualmente el gel teñido con Coomassie coloidal y la película fotográfica revelada. Las manchas seleccionadas se cortaron del gel y se enviaron al Servicio de Proteómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia) para su análisis por espectrometría de masas.

17- Aislamiento de proteínas de BBMV que unen el péptido pep-rec inmovilizado

El péptido pep-rec, cuya secuencia se indica en el apartado 7.2, se inmovilizó por su extremo N-terminal en una resina de polietilén glicol en el Laboratorio de Péptidos y Proteínas del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia).

La resina con pep-rec inmovilizado (50 mg) se lavó con 500 μL de tampón fosfato (Na_2HPO_4 8mM, KH_2PO_4 2mM, pH 11,0), centrifugando durante 1 min a 1.700 x g a temperatura ambiente. El sobrenadante correspondiente a 400 μL de BBMV (2,4 mg de proteína) obtenido tras la centrifugación a 20.817 x g durante 15 min a 4°C se dividió en alícuotas de 100 μL que fueron incubadas secuencialmente con la

resina durante 15 min, a 4°C en agitación. Tras cada incubación se eliminó el material no unido, centrifugando la mezcla durante 1 min a 1.700 x g a 4°C. Al cabo de 60 min, la matriz sólida con el material unido se sometió a 5 lavados con tampón fosfato, para eliminar las uniones inespecíficas. La elución se realizó incubando la matriz con 50 µL de tampón fosfato, pH 11,0 que contenía NaCl 0,25 M durante 5 min a 4°C y centrifugando 1 min a 1.700 x g a 4°C. La elución se repitió otras dos veces aumentando la concentración de NaCl a 0,5 M.

Las proteínas eluidas fueron analizadas por SDS-PAGE (apartado 9). A continuación, el gel se tiñó con plata utilizando el kit PlusOne™ Silver Staining (GE Healthcare) y se cortaron las bandas de interés para su análisis por espectrometría de masas en el Servicio de Proteómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia). El segundo de los eluidos también fue utilizado en el ensayo de corte del péptido fluorogénico sustrato de metaloproteasas ADAM (epígrafe 8).

18- Unión del péptido pep-rec a MECs de *L. decemlineata*

Para visualizar el patrón de distribución del péptido pep-rec en MECs, las células recién dissociadas (aproximadamente 5×10^6 en 10 µL de PBS) se incubaron durante 15 min con 0,25 µL del péptido pep-rec marcado con fluoresceína (pep-rec-FITC) 20 µg/µL diluido 1:100 (v:v) en DMSO:PBS. Para el análisis por microscopía se añadieron 12 µL de medio VECTASHIELD Hard Set con DAPI (Vector Laboratories) a MECs tratadas con pep-rec-FITC (aproximadamente $2,5 \times 10^6$ en 5µL), las muestras teñidas se colocaron en un portaobjetos de cristal y se observaron al microscopio Leica DM LB2.

19- Aislamiento de proteínas del intestino de *L. decemlineata* que unen calmodulina inmovilizada en una matriz de agarosa

Se partió de intestinos de larvas de cuarto estadio de *L. decemlineata*, los cuales se lavaron con 500 μL de tampón PBS pH 7,4 frío, centrifugando a 14.000 x g durante 5 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 1 mL de tampón de lisis frío, compuesto por NaCl 50 mM, NP-400, 5% (v/v), DTT 10 mM, ácido acetohidroxámico 100 μM , NaF 10 mM y 1 tableta de inhibidores de proteasas (Complete, Roche). La mezcla se homogeneizó mecánicamente durante 10 segundos en hielo en un homogeneizador ULTRA-TURRAX (IKA-Labortechnik). Seguidamente se centrifugó a 14.000 x g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante resultante se mezcló con 20 μL de una solución salina de calmodulina inmovilizada en perlas de agarosa (Sigma-Aldrich). La mezcla se incubó durante 2 h a 4°C en agitación. A continuación se separó el sobrenadante centrifugando a 14.000 x g durante 5 min a 4°C. La elución se llevó a cabo mediante tres incubaciones de 5 min del sedimento con 50 μL de tampón de lisis que contenía CaCl_2 0,2 μM , seguidas de una centrifugación de 5 min a 14.000 x g. Las proteínas contenidas en los eluidos se analizaron por SDS-PAGE (10%) y se tiñeron con azul de Coomassie (apartado 9) o se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (epígrafe 12) en la que se inmunodetectó la unión de Cry3Aa (apartado 13). Las bandas de proteínas cortadas del gel teñido con azul de Coomassie se analizaron por espectrometría de masas en el Servicio de Proteómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia).

20- Unión de la toxina Cry3Aa a calmodulina inmovilizada en una matriz de agarosa

Se adicionaron 50 μL de tampón PBS, pH 7,4 a 20 μL de perlas de agarosa que contenían calmodulina o glutatión inmovilizados (Sigma) y seguidamente la mezcla se centrifugó durante 10 min a 500 x g. Este proceso se realizó tres veces en total, en la etapa final la mezcla no se centrifugó, quedando las perlas de agarosa suspendidas en tampón PBS. A continuación, se incubaron 20 μl de toxina Cry3Aa 0,056 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con 20 μL de la solución de perlas de agarosa con calmodulina o

glutación (GSH) inmovilizados en un volumen final de 80 μL completado con tampón B (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1% (v/v)) en dos condiciones, con CaCl_2 0,1 mM ó EGTA 1 mM, durante 1h a 4°C en agitación. Seguidamente se llevaron a cabo tres lavados con 50 μL de tampón B que contenía CaCl_2 0,1 mM ó EGTA 1 mM, en cada caso, centrifugando a 500 x g durante 1 min. Los sedimentos obtenidos se resuspendieron en 20 μL de tampón PBS pH 7,4, se les adicionó tampón de muestra (Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, SDS 4% [p/v], glicerol 20% [v/v], DTT 100 mM, azul de bromofenol 0,01% [p/v]) y se calentaron durante 10 min a 95°C. A continuación la muestra se centrifugó a 500 x g durante 1 min y los sobrenadantes se analizaron por SDS-PAGE y *Western blot* para determinar la presencia de la toxina Cry3Aa unida (apartados 9, 12 y 13).

21- Ensayos de formación de poro de Cry3Aa en BBMV con calceína encapsulada

La encapsulación de calceína se llevó a cabo sonicando 3 veces durante 30 segundos las BBMV (300 μg de proteína total) en una solución que contenía calceína 80 mM (Molecular Probes, Eugene, OR), KCl 150 mM y CHAPS 10 mM, pH 9,0. La calceína libre se separó de las BBMV con el fluoróforo encapsulado por cromatografía de exclusión molecular, utilizando una columna Sephadex G-50 (1 x 30 cm) equilibrada con tampón de elución (KCl 150 mM, CHES 10 mM, pH 9,0). La elución se realizó utilizando una bomba peristáltica a baja velocidad. Se recogieron fracciones de 1 mL.

Para los ensayos de formación de poro se mezclaron 75 μg de BBMV con calceína encapsulada con 900 μL de KCl 150 mM, CHAPS 10 mM, pH 9,0 y se añadieron 20 μL de los sobrenadantes obtenidos tras la centrifugación a 20. 800 x g, durante 20 min, a temperatura ambiente, de Cry3Aa incubada durante 10 min con BBMV, según se describe en el apartado 7.2, en ausencia y en presencia del péptido pep-99 150 μM , del péptido pep-rec 2 mM ó de ácido acetohidroxámico 2 μM (concentraciones finales). Para el análisis de la formación de poros de la toxina Cry3Aa quimotripsinizada se procedió de manera análoga a la descrita para la toxina sin procesar, con la excepción de que previamente a la incubación con las

BBMV, la toxina se procesó con quimotripsina. Como control se añadieron la toxina Cry3Aa, Cry3Aa quimotripsinizada, pep-99, pep-rec y ácido acetohidroxámico a las mismas concentraciones que en los ensayos de incubación con BBMV.

Al final de cada experimento se ensayó la liberación máxima de calceína, para lo cual se lisaron las BBMV con Tritón X-100 0,1% (v/v). El aumento de la intensidad de la fluorescencia producido por la liberación de calceína se siguió a temperatura ambiente, con agitación constante y utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia VARIAN Cary Eclipse equipado con un soporte de celda controlado termostáticamente. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 490 y 520 nm, respectivamente.

22- Ensayos de citotoxicidad en MECs de *L. decemlineata*

- Citotoxicidad de Cry3Aa en presencia de TFP

Las células disociadas del epitelio intestinal (aproximadamente $2,5 \times 10^7$ en 50 μ L de tampón PBS, pH 7,4) se incubaron durante 30 min con 1,7 μ L de una solución de TFP 3 mM en DMSO ó con 1,7 μ L de DMSO, como control. A continuación las células se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente con 9 μ L de Cry3Aa 15,3 μ M ó con 9 μ L de Na_2CO_3 50 mM, pH 10,5, utilizado como control. Seguidamente, se incubaron 25 μ L de cada muestra con 25 μ L de azul de tripán 0,4% (p/v) durante 5 min. Para contar las células muertas teñidas de azul y las células vivas transparentes, las muestras se observaron al microscopio Leica DM LB2. La citotoxicidad se estimó como la razón entre las células muertas y las células totales. Los ensayos se realizaron por duplicado.

- Citotoxicidad de Cry3Aa en presencia de MCD

Las MEC (aproximadamente $2,5 \times 10^7$ en 50 μ L) se incubaron durante 30 min con 4,2 μ L de una solución de MCD 30 mM en agua (MCD 2,5 mM concentración final). Seguidamente las células se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente, con 20 μ L de Cry3Aa 14,5 μ M en Na_2CO_3 50 mM, pH 10,5 ó de Na_2CO_3

50 mM, como control. La citotoxicidad se analizó por exclusión de azul de tripán, de manera similar a como se ha descrito en el apartado anterior. Los ensayos se realizaron por duplicado.

- Citotoxicidad de los péptidos pep-rec, pep-rec barajado y pep-99

Las MECs (aproximadamente $2,5 \times 10^7$ en 50 μL) se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con 4,2 μL de una disolución del péptido pep-rec 12 mM en DMSO:PBS 1:10 (v:v), o con 4,2 μL de DMSO:PBS 1:10 (v:v), como control. Para ensayar la toxicidad de los péptidos pep-rec barajado (Ac-RFNYPFTGYHDQFGNS-NH₂) y pep-99, las MECs se incubaron independientemente con 4,2 μL de una disolución de cada péptido 12 mM en PBS. En todos los casos el volumen final fue de 30 μL , completado con tampón PBS pH 7,4. La citotoxicidad se analizó por exclusión de azul de tripán, de manera similar a como se ha descrito en los apartados anteriores. Los ensayos se realizaron por duplicado.

23- Ensayos de toxicidad de Cry3Aa en larvas de *L. decemlineata*

La toxicidad de Cry3Aa se ensayó en larvas de *L. decemlineata* de tercer estadio de desarrollo. En cada bioensayo se incluyeron 12 larvas que se mantuvieron sin comer durante 2 h en compartimentos individuales en cajas de 25 pocillos. Pasado el período de ayuno, cada larva se puso en contacto con un disco de hojas de patata de 0,24 cm², al que previamente se le había agregado toxina recién solubilizada, según se describe en el apartado 5.2. Tras ingerir el disco, las larvas se trasvasaron a un recipiente de plástico, se les añadió hojas de patata frescas y se mantuvieron en una cámara termorreguladora ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), durante 7 días. Al cabo de dicho período se contabilizó el número de larvas muertas. Los bioensayos se realizaron por triplicado.

En los ensayos de toxicidad de Cry3Aa en larvas en ausencia y en presencia de MCD se adicionó a los discos de hojas de patata 1 μL de una mezcla compuesta

por 0,3 μL de Cry3Aa 1 g/L y 0,7 μL de agua o de una solución de MCD 30 mM en agua. Como control de los tratamientos anteriormente mencionados las larvas ingirieron discos de hojas de patata previamente humedecidos con 1 μL de una mezcla compuesta por 0,3 μL de Na_2CO_3 50 mM, pH 10,5 y 0,7 μL de agua o de una solución de MCD 30 mM en agua.

Para ensayar la toxicidad de Cry3Aa en ausencia y en presencia del péptido pep-99, se agregó a los discos de hojas de patata una mezcla compuesta por 0,4 μL de Cry3Aa 0,75 g/L y 3 μL de tampón PBS pH 7,4 ó de una solución del péptido pep-99 10,68 mM en PBS pH 7,4. Como controles de estos tratamientos se incluyeron discos humedecidos con 0,4 μL de Na_2CO_3 50 mM, pH 10,5 y 3 μL de la solución del péptido pep-99 ó de PBS pH 7,4.

En los ensayos de toxicidad de Cry3Aa en ausencia y en presencia de ácido acetohidroxámico, los discos de hojas de patata se impregnaron con una mezcla compuesta por 0,4 μL de Cry3Aa 0,75 g/L y 3 μL de agua ó de una solución de ácido acetohidroxámico 13 mM en agua. Como controles de toxicidad, se adicionaron a los discos 0,4 μL de Na_2CO_3 50 mM, pH 10,5 y 3 μL de la solución de ácido acetohidroxámico o de agua.

Resultados

Resultados

1- Procesado proteolítico de Cry3Aa por proteasas asociadas al epitelio intestinal de *Leptinotarsa decemlineata*

1.1- Proteólisis de Cry3Aa catalizada por BBMV de *L. decemlineata*

En un trabajo anterior, nuestro grupo de investigación demostró que la interacción de Cry3Aa con vesículas de membrana del borde en cepillo del epitelio intestinal (BBMV) de *L. decemlineata* producía un notable incremento en la capacidad formadora de poro de la toxina *in vitro*, en comparación con la formación de poro producida por la toxina nativa o proteolizada con tripsina o quimotripsina (Rausell *et al.*, 2004). Se observó también que la interacción de la toxina con las vesículas de membrana producía la aparición de fragmentos de Cry3Aa de bajo peso molecular, evidenciándose que Cry3Aa es sustrato de una o varias proteasas asociadas a las BBMV.

Para estudiar el procesado proteolítico de Cry3Aa por las BBMV de *L. decemlineata* llevamos a cabo ensayos de incubación de la toxina con dichas vesículas. La proteólisis de Cry3Aa catalizada por las BBMV generó la aparición de fragmentos solubles que pudimos separar de las membranas de las vesículas por centrifugación. El análisis de los sobrenadantes por SDS-PAGE y *Western Blot* muestra que la proteólisis de Cry3Aa fundamentalmente condujo a la aparición de cinco fragmentos de toxina de masas moleculares aparentes de 47, 42, 38, 30 y 26 kDa (Figura 1). Dependiendo de la preparación de BBMV la intensidad relativa de un fragmento u otro puede variar y en ocasiones puede obtenerse un fragmento de 24 kDa.

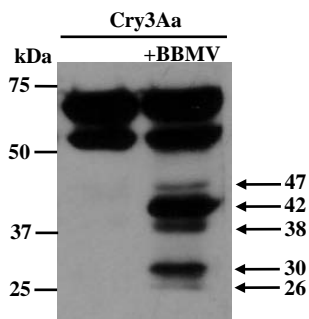


Figura 1.- Perfil peptídico de Cry3Aa generado por proteasas asociadas a BBMV de *L. decemlineata*. Inmunodetección de la toxina Cry3Aa en el sobrenadante obtenido tras su incubación con BBMV. Las flechas señalan los fragmentos de Cry3Aa generados y a su lado se indican sus masas moleculares. A la izquierda se señalan las masas moleculares de los marcadores utilizados.

Se analizó el efecto sobre la proteólisis de Cry3Aa del tiempo de incubación con las BBMVs de *L. decemlineata* y del pH de la mezcla de incubación. Según se aprecia en la Figura 2A, a 120 min, en comparación con la incubación de 10 min, se aprecia una disminución de la intensidad de los fragmentos de proteólisis de Cry3Aa, probablemente debido a que a medida que aumenta el tiempo de incubación dichos fragmentos también son proteolizados por las proteasas asociadas a las BBMVs. En relación al pH, la proteólisis tuvo lugar tanto a pH 7,4 como a pH 11,0 (Figura 2B). Decidimos realizar las incubaciones durante 10 min y trabajar a pH básico para evitar los problemas asociados a la insolubilidad de la toxina Cry3Aa, ya que se ha descrito que *in vitro* la toxina solubilizada precipita en soluciones de pH neutro o ligeramente ácido (Koller *et al.*, 1992).

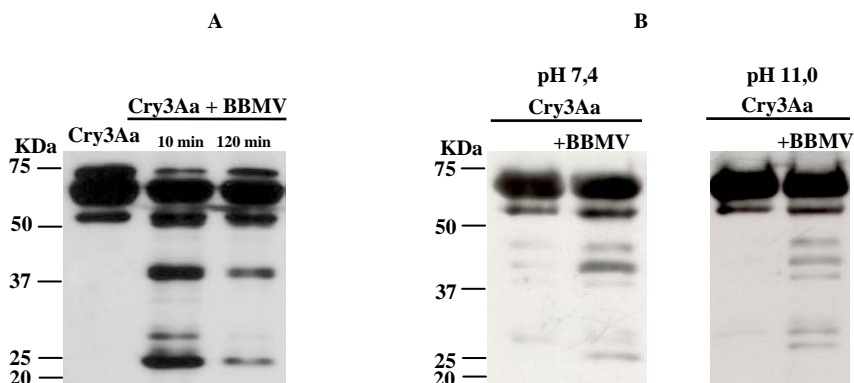


Figura 2.- Efecto del tiempo de incubación y el pH en la proteólisis de Cry3Aa catalizada por BBMVs de *L. decemlineata*. Inmunodetección de la toxina Cry3Aa en los sobrenadantes obtenidos tras su incubación con BBMVs durante 10 y 120 min (A) y a pH 11,0 ó 7,4 durante 10 min (B).

Adicionalmente se analizó la actividad proteolítica del sobrenadante obtenido tras la centrifugación de las BBMV de *L. decemlineata*, comprobándose que el perfil proteico de la toxina Cry3Aa generado por las proteasas separadas en el sobrenadante es similar al producido por las BBMV íntegras (Figura 3).

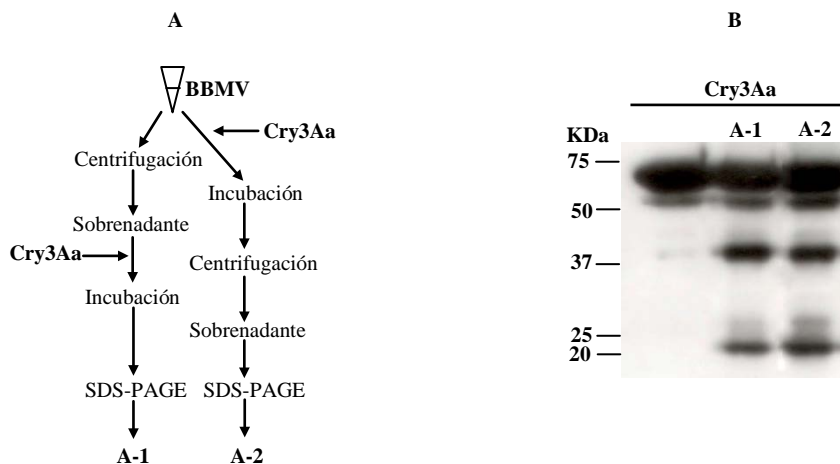


Figura 3.- Perfil peptídico de Cry3Aa generado por el sobrenadante de BBMV y por BBMV íntegras de *L. decemlineata*. A) Esquema de variantes de proteólisis de la toxina Cry3Aa catalizada por proteasas de BBMV. A-1) Incubación de la toxina Cry3Aa con sobrenadante de BBMV. A-2) Incubación de la toxina Cry3Aa con BBMV íntegras. B) Inmunodetección de la toxina Cry3Aa incubada con proteínas de BBMV en las condiciones representadas en A-1 y A-2.

1.2- Regiones de Cry3Aa por las que tiene lugar la proteólisis catalizada por BBMV de *L. decemlineata*

Con el objetivo de conocer las regiones de la toxina por las que tiene lugar la proteólisis, llevamos a cabo la separación por electroforesis bidimensional del sobrenadante obtenido tras la centrifugación de la mezcla resultante de la incubación de Cry3Aa con las BBMV y analizamos la secuencia amino terminal de los fragmentos producidos por la proteólisis. Para ello, marcamos cantidades equivalentes de la toxina Cry3Aa con los fluoróforos Cy5 ó Cy3. La toxina marcada con Cy5 fue incubada con BBMV para ser procesada proteolíticamente, mientras que la toxina marcada con Cy3 no se sometió a la proteólisis. A continuación, el sobrenadante obtenido tras la proteólisis de la toxina marcada con Cy5 se mezcló con la toxina marcada con Cy3 y la muestra resultante se separó por

electroforesis bidimensional. La imagen obtenida tras el escaneado de la fluorescencia del gel se muestra en la Figura 4.

Las manchas de bajo peso molecular y con fluorescencia roja corresponden a fragmentos de Cry3Aa procesada por las BBMV, las manchas verdes proceden de la toxina control y las amarillas corresponden a los fragmentos presentes tanto en la toxina control como en la proteolizada. Las proteínas así separadas fueron transferidas a una membrana de PVDF.

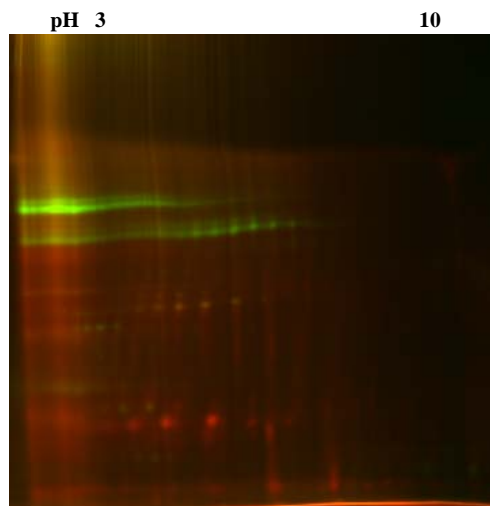


Figura 4. – Análisis por electroforesis bidimensional del perfil peptídico de la toxina Cry3Aa generado por BBMV de *L. decemlineata*. Escaneado fluorescente de los fragmentos separados por electroforesis bidimensional de una mezcla de 50 µg de toxina Cry3Aa sin procesar marcada con el fluoróforo Cy3 (manchas verdes) y 50 µg de toxina Cry3Aa proteolizada por BBMV marcada con Cy5 (manchas rojas). Las manchas amarillas corresponden a la superposición de manchas rojas y verdes. El rango de pH del isoelectroenfoco de la primera dimensión se indica en la parte superior de la figura.

Las manchas correspondientes a los fragmentos marcados con Cy5 (rojo) en el gel se escindieron de una membrana de PVDF y se secuenció su extremo N-terminal. De las manchas escindidas solo obtuvimos dos secuencias, SLDGA y DKV, cuyos extremos amino terminal corresponden a los residuos de serina 578 y ácido aspártico 631 de la secuencia de Cry3Aa, respectivamente. Tal y como se observa

en la representación esquemática de la estructura tridimensional de Cry3Aa (Figura 5) ambas secuencias se localizan en el dominio III de la toxina, en dos lazos expuestos y situados en el mismo plano.

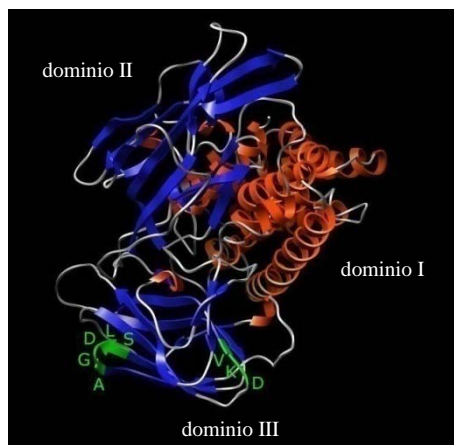


Figura 5.- Representación esquemática de la estructura tridimensional de la toxina Cry3Aa. El modelo gráfico de la toxina Cry3Aa se produjo con el programa Chimera (Pettersen *et al.*, 2004). Los segmentos correspondientes a las secuencias N-terminal de dos fragmentos de dominio III generados por la proteólisis catalizada por las BBMVs se representan en verde.

Para comprobar la especificidad de la proteólisis de Cry3Aa catalizada por proteasas asociadas a las BBMVs por la región representada por la secuencia SLDGA, se sintetizó un péptido de 12 aminoácidos (pep-99) que incluye dicha secuencia y los aminoácidos que la flanquean en la estructura primaria de Cry3Aa. El péptido pep-99, cuya secuencia aminoacídica es Ac-FTLSLDGAPFNQ-NH₂, se utilizó como competidor en ensayos de proteólisis de Cry3Aa por las BBMVs.

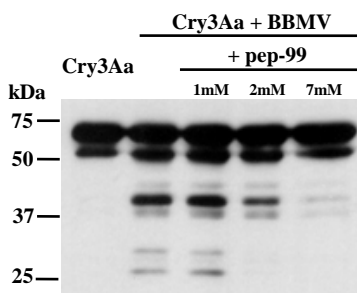


Figura 6.- Efecto del péptido pep-99 en la proteólisis de Cry3Aa catalizada por BBMVs de *L. decemlineata*. Inmunodetección de la toxina Cry3Aa en los sobrenadantes obtenidos tras su incubación con BBMVs en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes del péptido pep-99 (Ac-FTLSLDGAPFNQ-NH₂).

Según se observa en la Figura 6, el péptido pep-99 inhibe la aparición de los fragmentos de proteólisis de Cry3Aa y esta inhibición es dependiente de la concentración de péptido. Estos resultados indican que Cry3Aa es sustrato de proteasas asociadas a las BBMV de *L. decemlineata* y que la proteólisis tiene lugar de manera específica por regiones expuestas del dominio III. No obstante, no podemos descartar que la proteólisis también pueda tener lugar por otras regiones de la toxina, de cuyos péptidos resultantes no hayamos podido determinar la secuencia N-terminal.

1.3- Ensayos de inhibición de la proteólisis de Cry3Aa catalizada por BBMV de *L. decemlineata*

Como primera aproximación para la identificación de las proteasas asociadas a las BBMV de *L. decemlineata* implicadas en la proteólisis de Cry3Aa, nos propusimos conocer a qué clase pertenecen, según su mecanismo catalítico. Para ello, ensayamos la proteólisis de Cry3Aa en presencia de cócteles de inhibidores de clases específicas de proteasas. Según se observa en la Figura 7, la incubación de las BBMV en presencia de inhibidores de metaloproteasas (carrera M) produjo la inhibición casi total de la proteólisis de Cry3Aa. Los inhibidores de serín proteasas (carrera S) y cisteín proteasas (carrera C) también inhibieron la proteólisis de la toxina, apreciándose la desaparición de los fragmentos de 30 y 26 kDa y la disminución de la intensidad de los de 47, 42 y 38 kDa. El inhibidor de aspartil proteasas no produjo efecto significativo alguno (carrera A).

Para conocer a qué inhibidores específicos, de los contenidos en los cócteles empleados, resulta sensible la proteólisis de Cry3Aa, se ensayó la proteólisis en presencia de cada uno de los inhibidores de los tres tipos de proteasas cuya actividad se vio sensiblemente disminuida al utilizar cócteles de inhibidores de serín proteasas, cisteín proteasas y metaloproteasas. Tal y como se aprecia en la Figura 8, la leupeptina (L) y el TPCK, que son inhibidores de serín proteasas y de cisteín proteasas, y el inhibidor de cisteín proteasas E64 resultaron ser efectivos en la inhibición de la proteólisis de Cry3Aa por las BBMV.

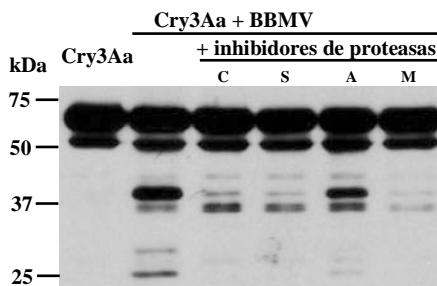


Figura 7.- Efecto de cócteles de inhibidores de clases específicas de proteasas en la proteólisis de Cry3Aa catalizada por BBMV. Inmunodetección de Cry3Aa en sobrenadantes obtenidos tras su incubación con BBMV en ausencia y en presencia de cócteles de inhibidores de proteasas: C, inhibidores de cisteín proteasas (PMSF1 mM, E-64 10 μ M, leupeptina 100 μ M); M, inhibidores de metaloproteasas (amastatina 0,1 mM, EDTA 10 mM, 1,10-fenantrolina 10 mM); S, inhibidores de serín proteasas (PMSF 1 mM, leupeptina 100 μ M, TPCK 0,1 mM, Pefabloc 5 mM, inhibidor de tripsina de soja 0,1 mg/ml); A, inhibidores de aspartil proteasas (pepstatina A 50 μ M).

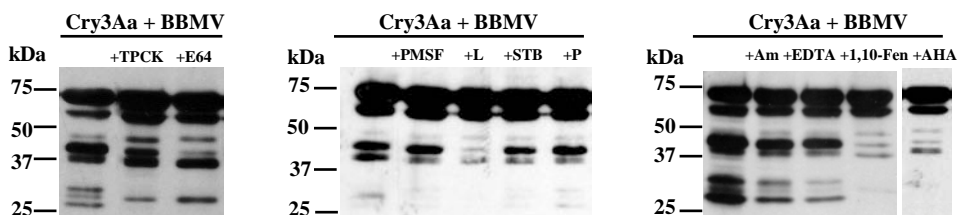


Figura 8.- Efecto de inhibidores específicos de proteasas en la proteólisis de Cry3Aa catalizada por BBMV. Inmunodetección de Cry3Aa en sobrenadantes obtenidos tras su incubación con BBMV en ausencia y en presencia de TPCK 0,1 mM; E-64 10 μ M; PMSF 1 mM; L, leupeptina 100 μ M; STB, inhibidor de tripsina de soja 0,1 mg/ml; P, Pefabloc 5 mM; Am, amastatina 0,1 mM; EDTA 10 mM; 1,10-fenantrolina 10 mM, AHA, ácido acetohidroxámico 100 mM. La última carrera (AHA) está separada del resto porque no es adyacente a las otras carreras en el gel.

En el caso de los inhibidores de metaloproteasas, la aparición de los fragmentos de proteólisis resultó fuertemente inhibida en presencia de 1,10-fenantrolina y ácido acetohidroxámico, inhibidores de metaloproteasas dependientes de zinc (Figura 8). Se analizó la inhibición de la proteólisis en presencia de diferentes concentraciones de 1,10-fenantrolina, resultando dependiente de la concentración de inhibidor (Figura 9).

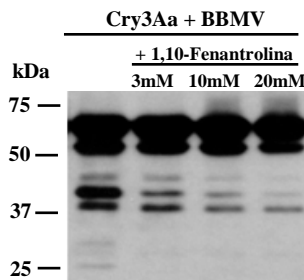


Figura 9.- Efecto del inhibidor de metaloproteasas 1,10-fenantrolina en la proteólisis de Cry3Aa catalizada por BBMV de *L. decemlineata*. Inmunodetección de Cry3Aa en sobrenadantes obtenidos tras su incubación con BBMV en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de 1,10-fenantrolina.

Los resultados anteriores indican que Cry3Aa puede ser sustrato de cisteín proteasas y de metaloproteasas dependientes de zinc asociadas a las BBMV de *L. decemlineata*.

1.4- Evidencias a favor de la proteólisis de Cry3Aa por cisteín y metaloproteasas asociadas a las BBMV de *L. decemlineata*

1.4.1- Identificación de proteasas que proteolizan Cry3Aa en BBMV de *L. decemlineata* mediante *Ligand blot*

Con el propósito de identificar las proteasas de las BBMV capaces de proteolizar la toxina Cry3Aa, analizamos la secuencia N-terminal de proteínas del sobrenadante obtenido tras la centrifugación de BBMV inmovilizadas en membranas de PVDF, a las que se unió la toxina.

Según se observa en la Figura 10, la inmunodetección de la unión de Cry3Aa tanto a las proteínas de BBMV separadas por SDS-PAGE monodimensional (Figura 10B, carrera 1) como bidimensional (Figura 10D) mostró que la toxina reconoció fundamentalmente proteínas de alrededor de 75, 50 y 30 kDa. Las bandas de aproximadamente 75 y 50 kDa fueron reconocidas por el anticuerpo anti-Cry3A en ausencia de toxina (Figura 10B, carrera 2). Por ello, se escindieron una banda de aproximadamente 30 kDa y otra de entre 37 y 50 kDa de la membrana bidimensional y se secuenciaron sus extremos N-terminal.

De las manchas cortadas, sólo obtuvimos secuencia del extremo N-terminal de la de alrededor de 30 kDa, la cual resultó una señal compleja compuesta por varias posibles secuencias de 6 aminoácidos cada una, en las que las posiciones 1, 4, 5 y 6 podían ser ocupadas por 2 aminoácidos cada una. A partir de estas secuencias se buscaron proteasas con homología de secuencia aminoacídica en la base de datos NCBIInr (“*National Center for Biotechnology Information*”, no redundante) (enero 2007), utilizando el programa BLASTp 2.2.23 (Altschul *et al.*, 1997). La secuencia SPDFKL resultó tener una elevada homología (6/6 identidades) con el precursor de la metaloproteasa ADAM10 de *Xenopus laevis*, alineándose en concreto con el prodominio del precursor de esta metaloproteasa, en la región extracelular de la proteína.

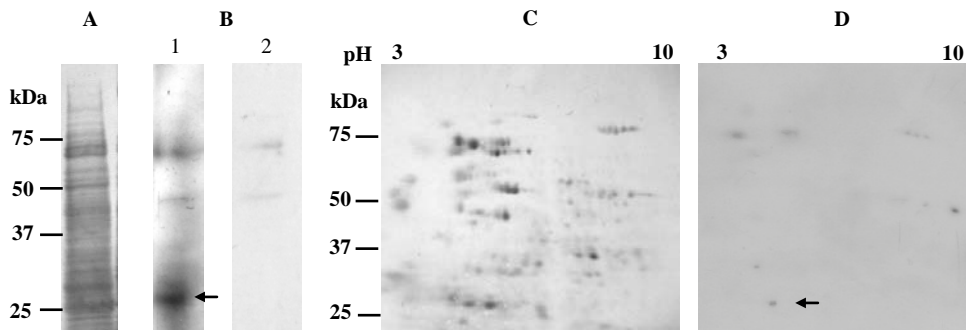


Figura 10.-Unión de la toxina Cry3Aa a proteínas de BBMV de *L. decemlineata*. Proteínas de BBMV separadas por electroforesis monodimensional (A) y bidimensional (C), transferidas a membranas de nitrocelulosa y teñidas con azul de Coomassie. Inmunodetección de la unión de Cry3Aa a proteínas de BBMV separadas por electroforesis monodimensional (B, carrera 1) y bidimensional (D). Detección de la unión a las proteínas de BBMV separadas por electroforesis monodimensional (B, carrera 2) del anticuerpo anti-Cry3Aa y del anticuerpo secundario conjugado a la fosfatasa alcalina. Las flechas en (B) y (D) indican la banda y la mancha de las cuales se obtuvo su secuencia N-terminal.

La búsqueda en la base de datos NCBIInr se repitió en mayo de 2010, encontrándose homología de la secuencia SPDFKL, además de con el precursor de la metaloproteasa ADAM10 de *X. laevis*, con el de *Xenopus (Sirulana) tropicalis*. Restringiendo la búsqueda en la base de datos del NCBIInr a insectos (taxid: 6960), la secuencia VPDSID también presentó homología con metaloproteasas de la subfamilia M12A de *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*, similares a la astacina de *Astacus astacus*, así como con varias intestinaínas, cisteín proteasas

digestivas de *L. decemlineata*. En la Tabla 1 se muestran las secuencias de los extremos N-terminal y la información concerniente a las proteasas con las que se encontró homología.

Secuencia N-terminal	Descripción	No. Acceso	Especie	Identicidades	M(kDa)	pI
SPDFKL	Precursor ADAM10	NP_001083912	<i>X. laevis</i>	6/6	83,94	7,3
VPDSID	Metaloproteasa de la subfamilia M12A (similar a astacina)	XP_001851187	<i>C. quinquefasciatus</i>	6/6	35,32	9
VPDSID	Cisteín proteasa digestiva intestina D-5	ABM55495	<i>L. decemlineata</i>	6/6	36,76	6

Tabla 1.- Proteasas con homología a las secuencias N-terminal obtenidas de proteínas de BBMV de *L. decemlineata* reconocidas por la toxina Cry3Aa. Se incluye la descripción de las proteasas, la especie a la que pertenecen, los números de acceso en la base de datos NCBI, las identidades y los valores de las masas moleculares calculadas y los puntos isoeléctricos (pI).

En el apartado 1.3 habíamos mostrado que el procesado proteolítico de Cry3Aa era inhibido por los inhibidores de metaloproteasas 1,10-fenantrolina y ácido acetohidroxámico. Tanto las metaloproteasas ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) como las metaloproteasas de la subfamilia M12A son inhibidas por los compuestos 1,10-fenantrolina y ácido acetohidroxámico (Wagner *et al.*, 2002; revisado en Seals y Courtneidge, 2003). Igualmente, en el apartado 1.3 hemos mostrado la inhibición de la proteólisis de Cry3Aa observada en presencia del inhibidor de cisteín proteasas E64, el cual se ha descrito que inhibe las intestaínas de *L. decemlineata* (Gruden *et al.*, 2003). La masa molecular calculada de la mayoría de estas proteasas es de aproximadamente 36 kDa y sus puntos isoeléctricos son ácidos, valores que se corresponden con la posición de la mancha cortada en la membrana.

Estos resultados sugieren que la proteólisis de la toxina Cry3Aa podría ser catalizada por metaloproteasas de las subfamilias de las ADAM y/o de las astacinas, asociadas a las BBMV de *L. decemlineata* y por cisteín proteasas, posiblemente digestivas, de la familia de las intestaínas de *L. decemlineata*.

1.4.2- Identificación de proteasas que proteolizan Cry3Aa en BBMV de *L. decemlineata* utilizando un agente de entrecruzamiento

Para confirmar la identidad de las proteasas asociadas a las BBMV que proteolizan Cry3Aa utilizamos una estrategia general que permite analizar las proteínas de las BBMV con las que interactúa la toxina en condiciones nativas, empleando el agente de entrecruzamiento trifuncional Sulfo-SBED (Pierce) que “transfiere” biotina a las proteínas de unión. La toxina biotilada se puso en contacto con las BBMV de *L. decemlineata* y mediante una reacción de fotoactivación y tras la adición de un agente reductor, las proteínas de las BBMV que unieron Cry3Aa quedaron marcadas con biotina y tras separarlas de la toxina, pudieron ser detectadas por *Western blot*. Tal y como se muestra en la Figura 11, en las muestras tratadas con DTT apareció una banda de masa molecular aparente de 30 kDa que no se observa en las muestras no reducidas, lo cual indica que Cry3Aa interactúa con una o varias proteínas de esa masa molecular aparente. En la Figura 11 puede apreciarse que la eficiencia en la transferencia de la marca de biotina fue baja, pues continúan observándose las bandas correspondientes a la toxina entre 75 y 50 kDa, además de bandas de bajo peso molecular presentes en las muestras tratadas con y sin DTT que probablemente correspondan a fragmentos de proteólisis de Cry3Aa originados por las BBMV.

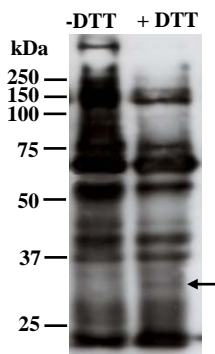


Figura 11.- Proteínas de BBMV de *L. decemlineata* que interactúan con la toxina Cry3Aa. La toxina Cry3Aa marcada con el agente de entrecruzamiento trifuncional Sulfo-SBED se incubó con BBMV, la mezcla se sometió a una reacción de fotoactivación y se añadió el agente reductor DTT. Las proteínas de BBMV que interactuaron con Cry3Aa quedaron marcadas con biotina y fueron detectadas por *Western blot*. La flecha indica una banda de 30 kDa que corresponde a proteínas de BBMV que interactúan con Cry3Aa.

Con el procedimiento utilizado, en el que llevamos a cabo el entrecruzamiento de la toxina Cry3Aa con las proteínas de BBMV con las que interactúa, en solución, como resultado de la interacción de la toxina con las BBMV también se produjo la proteólisis de la toxina. Para detectar proteínas de las BBMV capaces de unir Cry3Aa íntegra, las proteínas de las vesículas se separaron por electroforesis bidimensional y se inmovilizaron en una membrana de PVDF, la cual se incubó con una solución de toxina marcada con Sulfo-SBED. A continuación, se llevó a cabo la fotoactivación, quedando así marcadas con biotina las proteínas que interactuaron con Cry3Aa, las cuales fueron detectadas con estreptavidina. En la Figura 12B se aprecia que Cry3Aa interactuó con proteínas de entre 25 y 37 kDa, tal y como se había observado en el procedimiento anterior de incubación de la toxina con las BBMV en solución (Figura 11). Igualmente se detectaron proteínas de las BBMV de entre 75 y 100 kDa. Se recortaron 5 manchas de entre 75 y 100 kDa y 8 manchas de entre 25 y 37 kDa de un gel teñido con azul de Coomassie (Figura 12A), y se analizaron por espectrometría de masas.

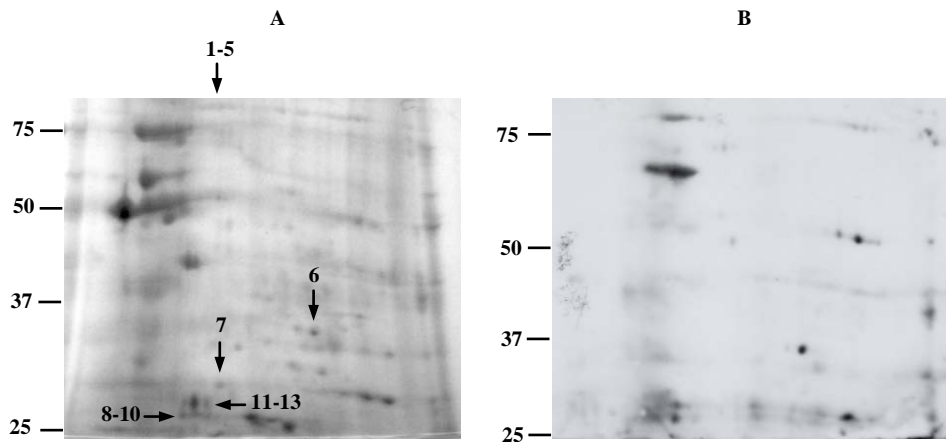


Figura 12.- Análisis por electroforesis bidimensional de las proteínas de BBMV que interactúan con Cry3Aa. A) Tinción con azul de Coomassie de proteínas de BBMV separadas por electroforesis bidimensional, las flechas indican las manchas cortadas para ser analizadas por espectrometría de masas y su número identificativo. B) Detección con estreptavidina de proteínas de BBMV que interactúan con Cry3Aa.

Las manchas escindidas se digirieron con tripsina y los fragmentos peptídicos resultantes se analizaron en un espectrómetro de masas con una fuente de ionización por láser asistida por matriz con analizadores de tiempo de vuelo en tándem (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*, MALDI TOF/TOF), obteniéndose así los espectros de masas (MS) de cada mancha cortada o huella peptídica. Adicionalmente, se adquirieron los espectros de fragmentación (MS/MS) de 5 de los péptidos mayoritarios en intensidad de cada huella peptídica. La identificación se llevó a cabo a partir de la información combinada de los espectros de MS y MS/MS, la cual se envió de manera automática a través del sistema GPS (*Global Protein Service*, Applied Biosystems) a la base de datos NCBIInr (restricción taxonómica a insectos) utilizando el algoritmo de búsqueda MASCOT (MatrixScience, UK). La información relacionada con las proteínas identificadas se resume en la Tabla 2.

No.	No. de acceso NCBI	Descripción	Especie	Score Mascot	pI	M (kDa)	Péptidos Identificados
1	XP_974860	Aconitasa	<i>T. castaneum</i>	140	8,2	86,23	29
2	XP_001663037	Aconitasa mitochondrial	<i>A. aegypti</i>	154	8,67	86,41	29
3	XP_974860	Aconitasa	<i>T. castaneum</i>	120	8,2	86,23	29
4	XP_317642	Aconitasa	<i>A. gambiae</i>	134	8,74	85,92	27
5	XP_317642	Aconitasa	<i>A. gambiae</i>	162	8,74	85,92	26
6	XP_624353	Aldocetoreductasa	<i>A. mellifera</i>	124	6,26	36,46	5
7	XP_974606	Prohibitina-1	<i>T. castaneum</i>	280	6,01	30,32	11
8	ABM55486	Intestaína D-6	<i>L. decemlineata</i>	86	8	36,75	12
9	AAS20591	Intestaína B-11	<i>L. decemlineata</i>	73	5,73	36,67	6
10	ABM55486	Intestaína D-6	<i>L. decemlineata</i>	206	8	36,75	20

Tabla 2.- Proteínas de BBMV de *L. decemlineata* que unen la toxina Cry3Aa. Se incluyen el número identificativo de cada mancha analizada por espectrometría de masas, el número de acceso de las proteínas identificadas en la base de datos NCBIInr, su descripción, la especie a la que pertenecen, el *score* máximo en Mascot, sus puntos isoeléctricos, sus masas moleculares calculadas y el número de péptidos identificados.

Dado que el genoma de *L. decemlineata* no ha sido secuenciado y existen muy pocas secuencias de proteínas de este organismo depositas en las bases de datos, la identificación de las proteínas de las BBMV a las que se unió Cry3A se basó fundamentalmente en la homología de la secuencia obtenida por espectrometría de masas con la de proteínas de otros insectos existentes en las bases de datos. En

todos los casos, el valor límite de *score* considerado para la asignación de identidad u homología fue de 80, excepto para la banda 6 que fue de 52.

La mejor asignación para la información de espectrometría de masas de las manchas numeradas del 1 al 5 corresponde a una proteína similar a aconitasa de los dípteros *A. aegypti* y *Anopheles gambiae* y del coleóptero *Tribolium castaneum*, para las cuales se obtuvieron *score* en Mascot de entre 120 y 162 y coberturas de las secuencias entre el 22 y el 30%. Las masas moleculares calculadas están en concordancia con las posiciones en que se sitúan en el gel bidimensional, así como los puntos isoeléctricos. Entre los resultados de espectrometría de masas para cada una de estas manchas también hay asignaciones para proteínas similares a aconitasas de otros insectos.

La identificación de la mancha 6 por MALDI TOF/TOF resultó negativa, por lo que se procedió al análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC MS/MS). Para ello, los péptidos resultantes de la digestión con tripsina fueron separados por cromatografía en fase reversa y posteriormente analizados en un espectrómetro de masas con una fuente de ionización por electronebulización (nano LC ESI QTOF). De esta manera se obtuvieron los espectros de cada una de los péptidos detectados por el espectrómetro de masas. La identificación se realizó enviando la información de MS/MS a la base de datos NCBIInr (restricción taxonómica a insectos) empleando el algoritmo de búsqueda MASCOT. En la mancha 6 se identificaron péptidos con homología a la proteína aldocetoreductasa de *Apis mellifera*, con un *score* de 124 en Mascot.

En el caso de la mancha 7, la mejor asignación según el análisis por MALDI TOF/TOF corresponde a una proteína con homología a prohibitina-1 de *T. castaneum*, con un elevado *score* en Mascot de 280 y un 24% de cobertura de la secuencia. Los valores de su masa molecular y el punto isoeléctrico coinciden con la posición de la mancha en el gel. En dicha mancha también se encontró homología con prohibitina-1 de otros insectos con elevados *score*. La masa molecular calculada de esta proteína igualmente coincide con la masa molecular aparente de la banda de proteínas de BBMV en la que se inmunodetectó la unión de Cry3Aa (Figura 11).

En las manchas numeradas del 8 al 10 se identificó intestaínas de *L. decemlineata* con valores de *score* en Mascot de 86 en la mancha 8 para la isoforma intestaína D-6, de 73 para la isoforma B-11 en la mancha 9 y de 206 en la mancha 10 para la isoforma D-6. Igualmente se identificaron las intestaínas D-4, D-5, D-8, D-11, D-12, D-15, B-2 y B-12. En la mayoría de los casos las masas moleculares calculadas se corresponden con la posición en el gel de donde fueron cortadas. Previamente, mediante una aproximación alternativa, también habíamos encontrado homología en la secuencia N-terminal de la proteína de BBMV a la que se unió Cry3Aa con la intestaína D-5 (apartado 1.4.1).

La identificación de las manchas numeradas del 11 al 13 resultó negativa, a pesar de que para cada una se obtuvieron espectros de buena calidad, lo cual podría deberse a la casi total ausencia de información sobre secuencias de proteínas de *L. decemlineata* en las bases de datos.

En la Figura 13 se muestra un alineamiento de las estructuras primarias de las intestaínas D-4, D-5, D-6 y B-11, en la que se aprecia una elevada conservación de sus secuencias aminoacídicas. Se señala en verde la secuencia N-terminal obtenida para la intestaína de las BBMV a la que se unió la toxina Cry3Aa (apartado 1.4.1). El resto de las intestaínas identificadas no fueron incluidas en el alineamiento puesto que en la base de datos NCBI sólo se dispone de fragmentos de sus secuencias. La identificación por espectrometría de masas de cisteín proteasas digestivas de *L. decemlineata* de la familia de las intestaínas, entre las proteínas de las BBMV que interactuaron con Cry3Aa y la presencia en ellas de la secuencia N-terminal de una proteína de las BBMV a la que se unió la toxina Cry3Aa (apartado 1.4.1) confirma la posible implicación de estas proteasas en el procesado proteolítico de Cry3Aa catalizado por las BBMV.

Intestinaína D-4	MKFLAIFATVLIIVTASTNEDQWIAFKQTHGKTYKNLLEEKTRFGIFQRNLIKIKEHNNAR 60
Intestinaína D-5	MKLLAIFATVLIIVTASTNEDQWIAFKQTHGKTYKNLLEEKTRFGIFQRNLIKIKEHNNAR 60
Intestinaína D-6	MKFLAIFATVLIIVTASTNEDQWIAFKQTHGKTYKNLLEERTRFGIFQRNLIKIKEHNNAR 60
Intestinaína B-11	MKLLAVFASVLLAVNALTDKQWVAFKQTHGKTYKSLLEERTRFGIFQSNLRKIEHNNAR 60 *:*
Intestinaína D-4	YDKGEETYLGGVTRFADLTHEEFKDLKGGIKNKPRLNATPTVFPEDLEVPDSIDWTEKG 120
Intestinaína D-5	YDKGEETYLLGVTRFADLTHEEFKDLKGGIKNKPRLNATPTVFPEDLEVPDSIDWTEKG 120
Intestinaína D-6	CDKGEETYLGGVTRFADLTHEEFKDLKGGIKNKPRLNATPTVFPEDLEVPDSIDWTEKG 120
Intestinaína B-11	YDKGEESYFLGVTPFADLTDFKDELRRQIKTKPNVEATLAVFPGLEVPDSIDWTQKG 120 *****:*:***** *****:**** *: ***,*.*.:** :****, *****:****
Intestinaína D-4	AVLEVKDQNPCGSCWAFSATGALKGQNAILNNVKISLSEQQLLDSCSAAYGNNGCKEGGDM 180
Intestinaína D-5	AVLEVKDQNPCGSCWAFSATGALEQNAILNNAKISLSEQQLLDSCSAAYGNNGCKEGGDM 180
Intestinaína D-6	AVLEVKGQNPCGSCWAFSATGALEQNAILNNAKISLSEQQLLDSCSAAYGNNGCKEGGDM 180
Intestinaína B-11	AVLDVYQGGCGSCWAFSATGALEQNAIVNNAKIPLSLSEQQLLDCKPKYGNDDCEHGGML 180 ***** * . *****:*****:*****:*.**.* ***** .**.* :*:* *
Intestinaína D-4	SAAFDYVRDYGIQSEKSYPIYRKQTECQYDASKTILKIKGYKNVTTSEGLRKAVGTIGP 240
Intestinaína D-5	SAAFDYVRDYGIQSEKSYPIYRKQTECQYDASKTILKIKGYKNVTTSEGLRKA VGTIGP 240
Intestinaína D-6	SAAFDYVRDYGIQSEKSYPIYRKQTECQYDASKTILKIKGYKNVTTSEGLRKA VGTIGP 240
Intestinaína B-11	SFAFDYVLDKIEADSSYPYKIDTPCQYDAKKTVLKIKGYKNVNSSEELKKA VGTIVGP 240 * **:* * * **:*.:**** :* *****.**:*****:*.** * :*****:****
Intestinaína D-4	ISIAMNSDPLQLYYSGTISGKGCSDLDHGVLVVVGYGKASQWSGETKFWRVKNSWGKIWG 300
Intestinaína D-5	ISIAMNSDPLQLYYSGTISGKGCSDLDHGVLVVVGYGKASQWSGETKFWRVKNSWGKIWG 300
Intestinaína D-6	MSIAMNSGPLQLYYSGTISGKGCSDLDHGVLVVVGYGKASQWSGETKFWRVKNSWGKIWG 300
Intestinaína B-11	VSVAIADADPIQLYFPGILDGLFCTHNLNHHGLAVGYGEDHLFGKKKFWKNSWGKIWG 300 *:*:*:*.**.*:*.** * **:*:*****:*****:*.** * :*****:***** **
Intestinaína D-4	ENGYFRIKRDANNLCGIADDDPTYPVL 326
Intestinaína D-5	ENGYFRIKRDANNLCGIADDDPTYPVL 326
Intestinaína D-6	ENGYFRIKRDANNLCGIADDDPTYPVL 326
Intestinaína B-11	EQGYFRIKRDANNLCGIADKASYPIL 326 *:*****:*****:*.** * *

Figura 13.- Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las cisteín proteasas digestivas intestinaínas D-4, D-5, D-6 y B-11. La secuencia N-terminal determinada en el apartado 1.4.1 se señala en verde, el resto de los colores representan los péptidos identificados por espectrometría de masas para cada proteína en este apartado. El alineamiento se llevó a cabo usando el programa CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>).

1.4.3- Análisis de la proteólisis de sustratos sintéticos de proteasas catalizada por BBMV de *L. decemlineata*

1.4.3.1- Proteólisis de sustratos sintéticos de cisteín proteasas

Para confirmar la susceptibilidad de la toxina Cry3Aa a cisteín proteasas de BBMV de *L. decemlineata* se analizó el corte proteolítico de dos sustratos sintéticos de cisteín proteasas (Barrett y Kirshke, 1981) que se ha descrito son proteolizados por cisteín proteasas digestivas aisladas de los intestinos de larvas del escarabajo de la patata (Gruden *et al.*, 2003; Goulet *et al.*, 2008).

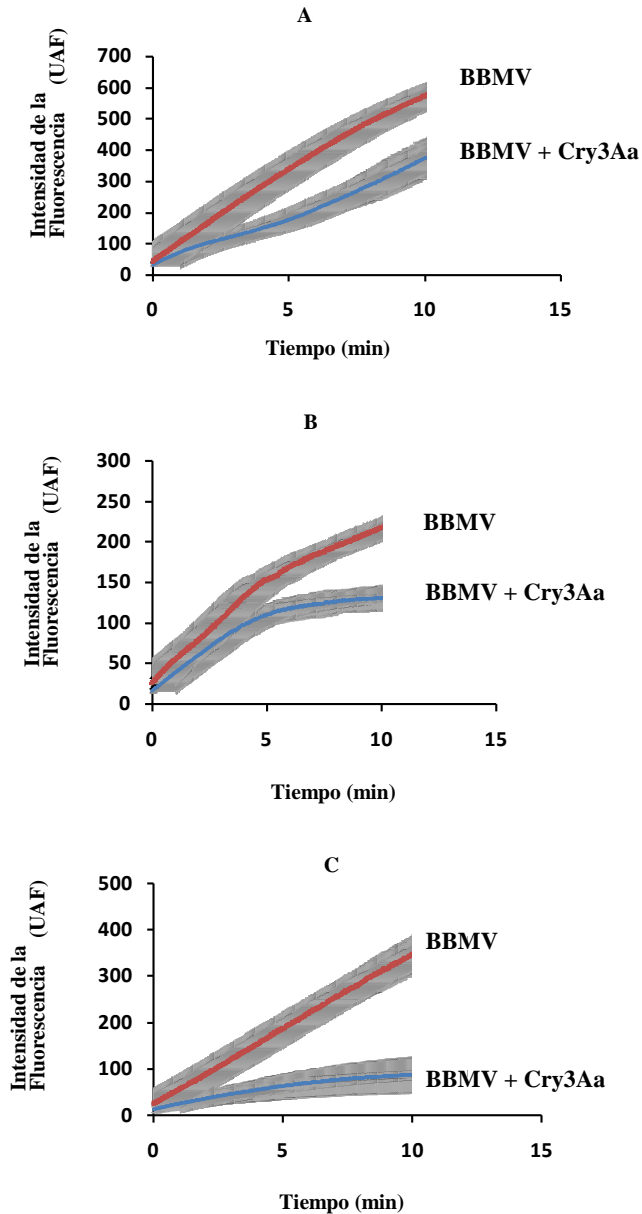


Figura 14.- Ensayo de corte de sustratos sintéticos fluorogénicos de cisteín proteasas. Se representa el aumento de la intensidad de la fluorescencia en función del tiempo por la proteólisis de los péptidos catalizada por las BBMV en ausencia y en presencia de Cry3Aa. A) Proteólisis del péptido Z-Arg-Arg-MCA, sustrato de cisteín proteasas similares a catepsina B; B) Proteólisis del péptido Z-Phe-Arg-MCA, sustrato de cisteín proteasas similares a papaína; C) Proteólisis del péptido Z-Phe-Arg-MCA, sustrato de cisteín proteasas similares a catepsina L. Las barras de error (contorno gris) representan el error estándar de experimentos realizados por duplicado.

En la Figura 14A se aprecia la capacidad de las BBMV íntegras para proteolizar el péptido fluorogénico Z-Arg-Arg-MCA (Sigma), sustrato específico de cisteín proteasas similares a catepsina B (Barrett y Kirshke, 1981).

Del mismo modo, las BBMV proteolizaron el péptido fluorogénico Z-Phe-Arg-MCA (Sigma), sustrato de cisteín proteasas similares a Papaína o a Catepsina L (Barrett y Kirshke, 1981), tanto en las condiciones en que se favoreció la actividad de tipo papaína (Figura 14B), como en las que se favoreció la actividad catepsina L (Figura 14C).

La toxina Cry3Aa compitió eficientemente la proteólisis de los dos sustratos anteriores (Figuras 14A, B y C), indicando que la toxina Cry3Aa es sustrato de cisteín proteasas presentes en las BBMV de *L. decemlineata* que poseen actividades similares a catepsina B, catepsina L y papaína, tales como las intestaínas, las cuales han sido identificadas como proteínas de las BBMV que unen la toxina Cry3Aa, en los apartados 1.4.1 y 1.4.2.

1.4.3.2- Proteólisis de un sustrato sintético de metaloproteasas tipo astacina

De acuerdo con los resultados de los ensayos de proteólisis en presencia de inhibidores de proteasas (1.3) y la identificación de proteasas de las BBMV a las que se unió la toxina Cry3Aa (apartado 1.4.1), en las BBMV de *L. decemlineata* podrían estar presentes metaloproteasas de la subfamilia de las astacinas capaces de interaccionar con la toxina Cry3Aa. Por ello, se analizó la proteólisis producida por las BBMV del péptido sintético Suc-Ala-Ala-Ala-pNA (Bachem), descrito como sustrato de la metaloproteasa astacina (Stöcker y Zwilling, 1995).

Tal y como se aprecia en la Figura 15, las BBMV de *L. decemlineata*, incluso en una cantidad cinco veces superior a la utilizada en la proteólisis de sustratos sintéticos de cisteín proteasas (Figura 1.4.3.1), no fueron capaces de proteolizar dicho péptido, indicando la ausencia de actividad metaloproteasa de tipo astacina en las BBMV.

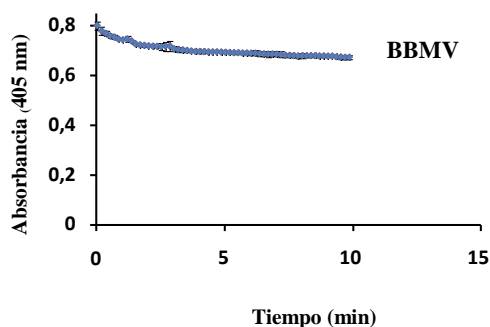


Figura 15.- Ensayo de corte de un sustrato sintético de astacina. Variación de la absorbancia en función del tiempo producida por la proteólisis del péptido Suc-Ala-Ala-Ala-pNA catalizada por BBMVs de *L. decemlineata*. Las barras de error representan el error estándar de experimentos realizados por duplicado.

1.4.3.3- Proteólisis de un sustrato sintético de metaloproteasas tipo ADAM

Las metaloproteasas de la familia de las ADAM son el tercer tipo de proteasas para las que hemos encontrado evidencias que indican que podrían estar presentes en las BBMVs de *L. decemlineata* y proteolizar la toxina Cry3Aa (apartados 1.3 y 1.4.1). Para comprobar su presencia llevamos a cabo ensayos de corte proteolítico incubando el sobrenadante de BBMVs, en el que habíamos confirmado la presencia de las proteasas que proteolizan Cry3Aa (Figura 3), con el sustrato sintético Mca-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂ (BIOMOL International LP) que se ha descrito es hidrolizado por ADAM10 (Amour *et al.*, 2000). Dicho sustrato contiene una estructura cuya fluorescencia se encuentra internamente atenuada por la interacción con otra región del sustrato, de manera que si el sustrato es proteolizado ambas estructuras se separan y tiene lugar un aumento en la fluorescencia. Según se observa en la Figura 16, el aumento en la intensidad de la fluorescencia indica que el sobrenadante de las BBMVs contiene una actividad enzimática capaz de cortar un sustrato de ADAM10. La adición de Cry3Aa compitió eficientemente dicho corte, confirmando la implicación de una metaloproteasa de tipo ADAM en su proteólisis.

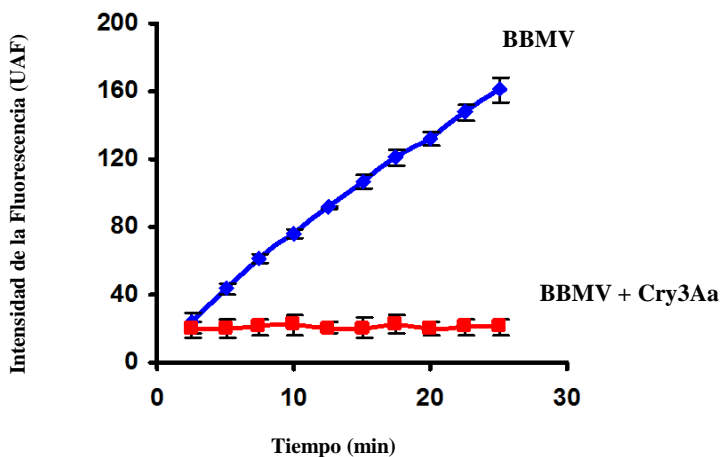


Figura 16.- Ensayo de corte de un péptido sintético fluorogénico sustrato de metaloproteasas tipo ADAM. Aumento de la intensidad de la fluorescencia en función del tiempo por la proteólisis del péptido Mca-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂ catalizada por el sobrenadante de BBMV en ausencia y en presencia de Cry3Aa. Las barras de error representan el error estándar de experimentos realizados por duplicado.

1.4.4- Implicación de una actividad metaloproteasa de tipo ADAM asociada a las BBMV de *L. decemlineata* en la proteólisis de Cry3Aa

Hemos comprobado que existen cisteín proteasas digestivas de tipo insteáinas y metaloproteasas, probablemente de la familia de las ADAM, asociadas a las BBMV de *L. decemlineata* que proteolizan la toxina Cry3Aa. Dado que los genes que codifican para las insteáinas han sido previamente aislados en *L. decemlineata* (Gruden *et al.*, 2004) y que la interacción de las toxinas Cry de Bt con la membrana del epitelio intestinal del insecto diana es un evento de gran relevancia en su modo de acción, nos propusimos profundizar en el estudio de la proteólisis de la toxina catalizada por la metaloproteasa de membrana ADAM.

1.4.4.1- Aislamiento del gen de una metaloproteasa ADAM de *L. decemlineata*.

Nos planteamos amplificar mediante PCR el gen de la metaloproteasa ADAM de *L. decemlineata* como primera aproximación en el análisis de su implicación en la

proteólisis de la toxina Cry3Aa. Para ello, se diseñaron cebadores considerando la información procedente de la estructura primaria de dicha subfamilia de proteínas, que presenta una estructura de dominios altamente conservada. Se sintetizó un oligonucleótido degenerado a partir de la secuencia SPDFKL obtenida por secuenciación N-terminal de una proteína de las BBMV de *L. decemlineata* de la que habíamos encontrado homología con el precursor de la metaloproteasa ADAM10 de *X. laevis* (apartado 1.4.1). Igualmente se diseñaron cebadores a partir de las secuencias de unión a zinc HELGH y HEIGH altamente conservadas en el dominio metaloproteasa y de la secuencia conservada en el dominio desintegrina GEE/QCDCG. Los fragmentos de ADN amplificados por PCR se secuenciaron y se realizaron búsquedas de homología en las bases de datos utilizando el programa BLASTn 2.2.24 (Altschul *et al.*, 1997). No se encontró homología de secuencia con metaloproteasa alguna, por lo que seguimos una estrategia alternativa para su identificación.

1.4.4.2- Análisis de la región de reconocimiento de Cry3Aa por la metaloproteasa ADAM

Hattori *et al.* (2000) identificaron con el programa MEME (Grundy *et al.*, 1996) un motivo conservado fuera del sitio de corte en 11 proteínas que son sustrato de ADAM10 ó su homólogo en *Drosophila melanogaster*, Kuzbanian. Cuando aplicamos este programa a la toxina Cry3Aa encontramos que dicha secuencia consenso está presente en su estructura primaria, en la región comprendida entre los aminoácidos 350 y 357 (Figura 17). Parte de esta secuencia se localiza en una región del lazo 1 del dominio II, entre los residuos de arginina 345 y ácido aspártico 354, en la que previamente Wu *et al.* (2000) habían llevado a cabo sustituciones de aminoácidos que afectaron la afinidad de la unión y la toxicidad de Cry3Aa en *L. decemlineata*.

<u>Protein</u>	<u>Start</u>	<u>Sequence</u>
mEphrin-A2	122	RPAAPGGPLK FSEKFLF TPFSLGFEF
mEphrin-B1	110	TCNKPHQEIR FTIKFQEF SPNYMGLF
mDelta 1	25	LLCQVWSSGV FELKLEF VNKKGLLGNR
mTNF- α	161	YVLLTHTVSR FAISYQEK VNLLSAVKSP
mAPP	681	MDAEFGHDSG FEVRHQKL VFFAEDVGSN
Cry3Aa1	350	HLFDYLHRIQ FHTRFQPG YYGNDSFN
	consenso	F E I K F Q E F R

Figura 17.- Secuencia de reconocimiento conservada en proteínas sustrato de ADAM10. La secuencia consenso fue identificada en Cry3Aa1 con el programa MEME (Grundy *et al.*, 1996).

Para estudiar la relevancia de la interacción de Cry3Aa y la metaloproteasa ADAM de *L. decemlineata* a través de la secuencia consenso de reconocimiento, sintetizamos un péptido de 16 aminoácidos (Ac-FHTRFQPGYYGNDSFN-NH₂) denominado pep-rec que incluía dicha secuencia de reconocimiento y la región en la que se llevaron a cabo las sustituciones de aminoácidos por Wu *et al.* (2000) (Figura 18A).

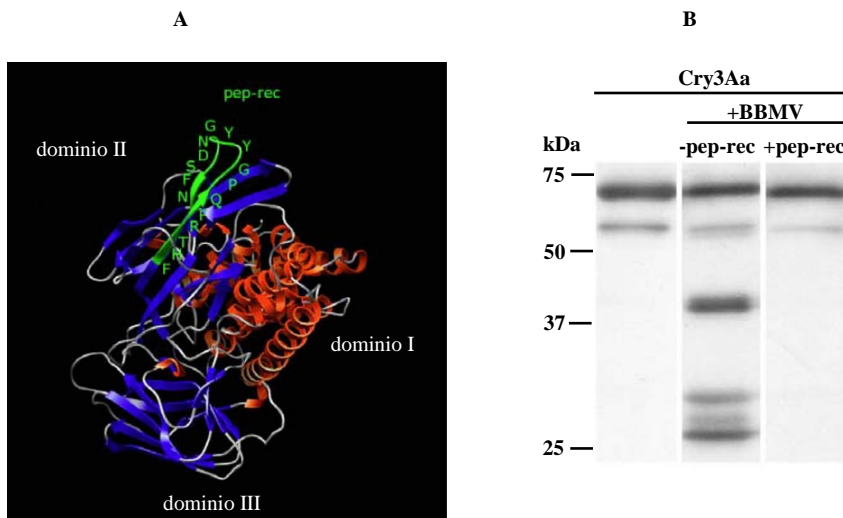


Figura 18.- Presencia de una secuencia de reconocimiento de proteínas sustratos de ADAM10 en la toxina Cry3Aa. A) Representación esquemática de la estructura tridimensional de Cry3Aa obtenida con el programa Chimera (Pettersen *et al.*, 2004), en verde se señala un segmento de la región de reconocimiento a partir de la cual se diseñó el péptido pep-rec. B) Proteólisis de Cry3Aa catalizada por BBMV en ausencia y en presencia del péptido pep-rec.

El péptido pep-rec fue utilizado como competidor en ensayos de proteólisis de Cry3Aa por las BBMV. Tal y como se observa en la Figura 18B, la presencia del péptido pep-rec inhibió totalmente la aparición de los fragmentos de proteólisis de Cry3Aa, indicando que la región representada por este péptido puede ser relevante para la interacción de la toxina con la metaloproteasa ADAM.

Con el objetivo de conocer las regiones del epitelio intestinal a las que se une Cry3Aa a través de la secuencia representada por el péptido pep-rec, analizamos la unión de dicho péptido en el epitelio intestinal de *L. decemlineata* (Figura 19).

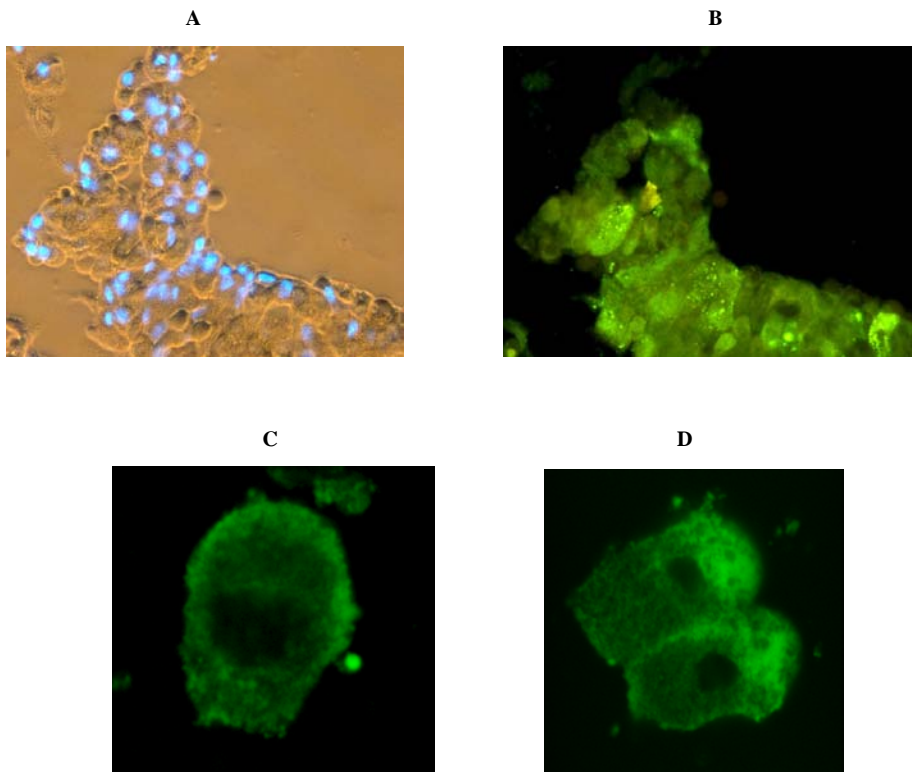


Figura 19.- Unión del péptido pep-rec al epitelio intestinal de *L. decemlineata*. Imagen del epitelio intestinal por transmisión de luz blanca superpuesta con una tinción con DAPI (azul) que representa los núcleos de las células (A). Unión del péptido pep-rec marcado con fluoresceína (verde) al epitelio intestinal (B). Unión del péptido pep-rec marcado con fluoresceína (verde) a células disociadas del epitelio intestinal (C y D).

Para ello, el péptido pep-rec se marcó con el fluoróforo fluoresceína y se puso en contacto con una porción intacta del epitelio intestinal, en la que se observó fluorescencia en algunas células (Figura 19A y B). Seguidamente se analizó la unión del péptido fluorescente a células disociadas del epitelio intestinal (MEC), en las que previamente habíamos comprobado que no existía autofluorescencia. En la Figura 19C se aprecia que el péptido se localizó preferentemente en la superficie apical de las células columnares. Adicionalmente observamos que en las células que no se habían disociado completamente, el péptido marcado también se localizó en las regiones de contacto basolateral entre las células, en las cuales las uniones de comunicación podrían ser sitios potencialmente importantes para la acción de las toxinas Cry de Bt (Figura 19D).

El péptido pep-rec se empleó también en una estrategia de separación por afinidad diseñada para aislar proteínas de BBMV que se unen a Cry3Aa a través de la región representada por dicho péptido. Para ello, el péptido se inmovilizó en una matriz sólida que se incubó con proteínas del sobrenadante de BBMV.

Para confirmar la presencia de la metaloproteasa de la familia de las ADAM en la fracción eluida, llevamos a cabo ensayos de corte de un sustrato sintético de ADAM10, previamente utilizado en el apartado 1.4.3.3, empleando el eluido de la matriz con pep-rec inmovilizado y sobrenadante de BBMV, como control. El aumento en la intensidad de la fluorescencia del péptido que se observa en la Figura 20 muestra que tanto las BBMV como las proteínas de las BBMV eluidas de la matriz con pep-rec inmovilizado cortan el sustrato sintético de ADAM10. En la Figura 20 también se muestra que la adición de NaCl, a la misma concentración que la empleada para la elución de las proteínas retenidas en la matriz con pep-rec inmovilizado, produjo una drástica disminución en la intensidad de la fluorescencia del sustrato, que se corresponde con la obtenida al proteolizar el sustrato con el eluido de la matriz de pep-rec.

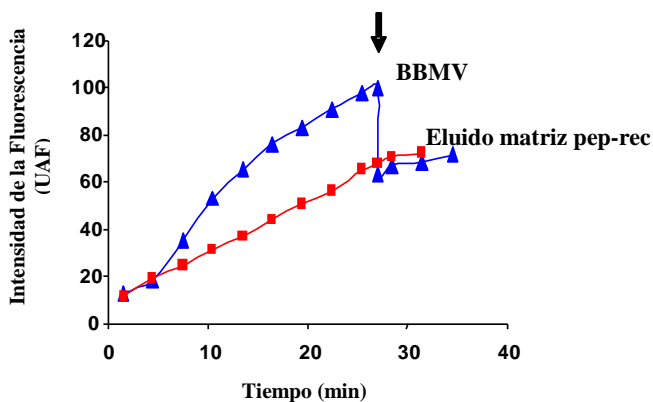


Figura 20.- Actividad proteolítica de tipo ADAM en proteínas de BBMV eluidas de una matriz que contenía el péptido pep-rec. Aumento de la intensidad de la fluorescencia en función del tiempo por la proteólisis de un péptido sustrato de metaloproteasas tipo ADAM catalizada por sobrenadante de BBMV (trazo azul) y por las proteínas eluidas de la matriz de pep-rec (trazo rojo). La flecha indica la adición de NaCl a las BBMV a la misma concentración que la utilizada para la elución de las proteínas unidas a la matriz con pep-rec inmovilizado. Los experimentos se realizaron al menos por triplicado, las barras de error se omiten para mayor claridad en la figura, no obstante los errores estándar fueron siempre menores del 13%.

Las proteínas contenidas en la fracción eluida de la matriz que contenía pep-rec inmovilizado se separaron por SDS-PAGE (Figura 21) y se analizaron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS/MS).

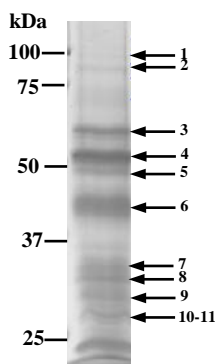


Figura 21.- Proteínas de BBMV eluidas de una matriz que contenía el péptido pep-rec inmovilizado. Tinción de plata de las proteínas de BBMV retenidas y eluidas de la matriz de pep-rec, separadas por SDS-PAGE (10%). Se señalan las bandas cortadas para su análisis por espectrometría de masas y su número identificativo.

La identificación se realizó enviando la información de MS/MS a las bases de datos Swiss Prot y NCBIInr (restricción taxonómica a insectos), usando el algoritmo de búsqueda MASCOT (MarixScience, UK). En la Tabla 3 se resume la información relativa a las proteínas identificadas.

No.	No. acceso NCBI	Descripción	Especie	Mascot Score	M (kDa)	Péptidos Identificados
1	Q7PT10	Proteína de choque térmico Hsp83	<i>A. gambiae</i>	38	78,59	1
2	EAL31813	Proteína de choque térmico Hsp70	<i>D. pseudoobscura pseudoobscura</i>	212	72,37	7
3	XP_975184	Proteína disulfuro isomerasa	<i>T. castaneum</i>	222	91	7
4	XP_001811586	Similar a proteína de fusión sensible a N-etilmaleimida	<i>T. castaneum</i>	318	128,24	3
5	XP_001811586	Similar a proteína de fusión sensible a N-etilmaleimida	<i>T. castaneum</i>	163	128,24	4
6	CAA66218	Actina A3a	<i>H. armígera</i>	145	42,15	4
7	AAS20589	Intestaina A-26	<i>L. decemlineata</i>	120	36,72	4
8	AAS20589	Intestaina A-26	<i>L. decemlineata</i>	190	36,72	5
9	P92177	14-3-3 Proteína Epsilon	<i>D. melanogaster</i>	78	29,95	3
10	P29310	14-3-3 Proteína Zeta	<i>D. melanogaster</i>	74	28,32	3
11	P29310	14-3-3 Proteína Zeta	<i>D. melanogaster</i>	263	28,32	8

Tabla 3.- Proteínas de BBMV de *L. decemlineata* eluidas de una matriz que contenía el péptido pep-rec inmovilizado. Se incluyen los números identificativos de cada banda analizada por espectrometría de masas, el número de acceso de las proteínas en la base de datos NCBI, su descripción, la especie a la que pertenecen, el *score* máximo en Mascot, sus masas moleculares calculadas y el número de péptidos identificados para cada una.

La mejor asignación para la banda 1 corresponde a una proteína con homología a la proteína de choque térmico de 83 kDa (Hsp83) de *A. gambiae*, con un *score* en Mascot de 38, siendo el *score* a partir del cual se consideró la homología estadísticamente significativa de 36. Se encontró homología con proteínas de otros insectos pertenecientes a la misma familia con igual *score*.

En la banda 2 se identificó una proteína con homología a la isoforma 3 de la proteína de choque térmico de 70 kDa de *D. melanogaster* con un *score* de 212 y a la proteína Hsp83 de *A. gambiae* con un *score* de 119 (valor límite de *score* 39).

La banda 3 corresponde a una proteína con homología a disulfuro isomerasa de *T. castaneum* con un *score* de 222 en Mascot (*score* mínimo de 49).

En las bandas 4 y 5 se identificó una proteína similar a la proteína de fusión sensible a N-etilmaleimida de *T. castaneum* con *score* en Mascot de 318 y 163, respectivamente (*score* mínimo de 49).

En la banda 6 se identificó una proteína con homología a actina de *Helicoverpa armigera* y *D. melanogaster* con *score* en Mascot de 145, en esta banda también se encontró similitud con actinas de otros organismos con menor *score* (*score* mínimo de 49).

Las bandas 7 y 8 corresponden a la cisteín proteasa digestiva intestinal A-26 de *L. decemlineata*, con *score* de 120 y 190 en Mascot, respectivamente (*score* mínimo de 38). En los apartados 1.4.1 y 1.4.2 habíamos identificado varias de estas proteasas entre las proteínas de las BBMV que interactúan con Cry3Aa.

En la banda 9 se identificó una proteína con homología a 14-3-3 épsilon de *D. melanogaster* con un *score* máximo en Mascot de 78. Igualmente en las bandas 10 y 11 se encontró homología con la proteína 14-3-3 Zeta de *D. melanogaster* con *score* máximos en Mascot de 74 y 263, respectivamente. Los valores límites de *score* en cada banda fueron de 36, 35 y 38, respectivamente.

En todos los casos las masas moleculares calculadas coinciden con las masas moleculares aparentes en el gel, excepto en las bandas 3, 4 y 5, cuyas masas moleculares aparentes son menores que las de las proteínas identificadas.

1.4.4.3- Efecto de moduladores de la actividad de metaloproteasas ADAM en la proteólisis de Cry3Aa

Dado que con la estrategia del apartado anterior no identificamos la metaloproteasa ADAM, probablemente debido a que no existen secuencias de metaloproteasas ADAM de *L. decemlineata* depositadas en las bases de datos, se analizó la influencia en el procesado proteolítico de Cry3Aa por las BBMV de *L. decemlineata* de compuestos que se ha descrito que aumentan el corte catalizado

por metaloproteasas de la familia de las ADAM, tales como el éster de forbol PMA y el compuesto organomercuríco APMA, el compuesto extractor de colesterol MCD, el inhibidor de calmodulina TFP y los inductores de la entrada de calcio al interior de la célula ionomicina y A23187.

Con este fin, llevamos a cabo ensayos de incubación de Cry3Aa con BBMV de *L. decemlineata* que habían estado previamente en contacto con cada uno de estos compuestos. Según se observa en la Figura 22A, el TFP produjo un notable incremento en el procesamiento proteolítico de la toxina. Por el contrario, el MCD produjo la inhibición de la proteólisis de Cry3Aa, efecto que resultó dependiente de su concentración (Figura 22B). El resto de los compuestos ensayados no produjeron efecto alguno en la proteólisis de la toxina por las BBMV (Figura 22C).

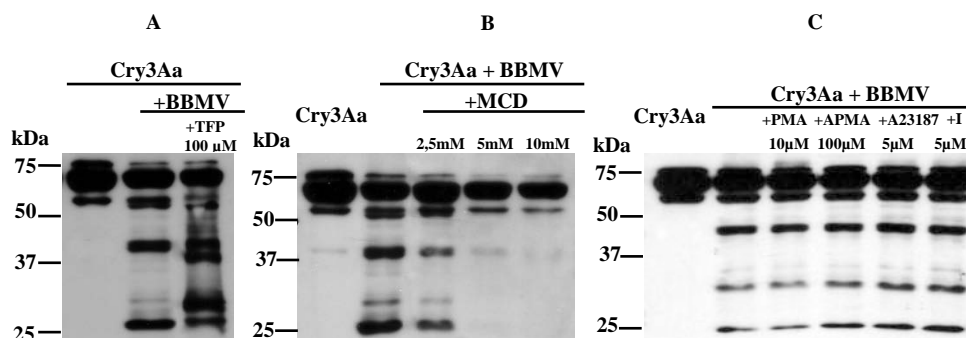


Figura 22.- Efecto de moduladores de la actividad proteolítica de metaloproteasas ADAM en la proteólisis de Cry3Aa catalizada por las BBMV. Inmunodetección de Cry3Aa en sobrenadantes obtenidos tras su incubación con BBMV en ausencia y en presencia de: A) TFP; B) concentraciones crecientes de MCD; C) PMA, APMA, A23187 e ionomicina.

Considerando el efecto observado con el TFP en la proteólisis de Cry3Aa por las BBMV y dado que este compuesto es un inhibidor de calmodulina, nos propusimos profundizar en el análisis de la posible implicación de esta proteína en el procesamiento proteolítico de Cry3Aa por las BBMV. Para ello, ensayamos la proteólisis de la toxina catalizada por BBMV previamente incubadas con calmodulina. Tal y como se aprecia en la Figura 23, esta proteína produjo una disminución en la intensidad de los fragmentos de proteólisis de Cry3Aa que indica que su presencia inhibió la proteólisis de Cry3Aa catalizada por las BBMV.

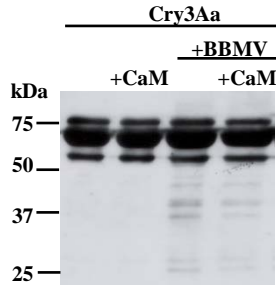


Figura 23.- Efecto de calmodulina en la proteólisis de Cry3Aa catalizada por las BBMV. Inmunodetección de Cry3Aa en sobrenadantes obtenidos tras su incubación con BBMV en ausencia y en presencia de calmodulina (25 U/μL). Se incluye un control de Cry3Aa incubada con calmodulina en ausencia de BBMV.

La calmodulina regula el corte catalizado por metaloproteasas de la familia de las ADAM que produce la liberación de los fragmentos solubles de varias proteínas de membrana. Se ha descrito que la implicación de la calmodulina en la regulación de dicho proceso puede deberse a su interacción con la metaloproteasa o a su unión a las proteínas de membrana sustrato de las ADAM. En todos los casos la presencia de calmodulina produce la inhibición del corte proteolítico (Kahn *et al.*, 1998; Díaz-Rodríguez *et al.*, 2000; Kalus *et al.*, 2003; Nagano *et al.*, 2004; Llovera *et al.*, 2004; Lambert *et al.*, 2008).

Para conocer si la implicación de la calmodulina en la regulación de la proteólisis de Cry3Aa catalizada por las BBMV de *L. decemlineata* se debía a su interacción directa con la toxina, analizamos la unión *in vitro* de ambas proteínas. Para ello, se llevó a cabo la incubación de la toxina Cry3Aa con calmodulina inmovilizada en perlas de agarosa en presencia de EGTA o de iones Ca^{+2} (Figura 24A). Como control, se realizó la incubación de la toxina con glutatión (GSH) inmovilizado en perlas de agarosa (Figura 24A). Las proteínas eluidas de ambas matrices se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en las que se inmunodetectó la presencia de Cry3Aa. Tal y como se observa en la Figura 24B, la toxina Cry3Aa fue únicamente detectada en el material eluido de la matriz que contenía calmodulina inmovilizada, tanto en ausencia como en presencia de iones Ca^{2+} . Estos resultados indican que la toxina Cry3Aa interactúa de manera específica con calmodulina y que dicha interacción no depende de la presencia de iones calcio.

Adicionalmente, analizamos las proteínas del epitelio intestinal de larvas de *L. decemlineata* que quedaron retenidas en una matriz de agarosa con calmodulina inmovilizada y que además unieron Cry3Aa. Para ello, las proteínas eluidas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en la que se inmunodetectó la unión de Cry3Aa. En la Figura 26A se aprecia que la toxina se unió fundamentalmente a bandas de masas moleculares aparentes de 44 y 28 kDa, las cuales se escindieron del gel (Figura 26B) y se analizaron por espectrometría de masas (LC MS/MS).

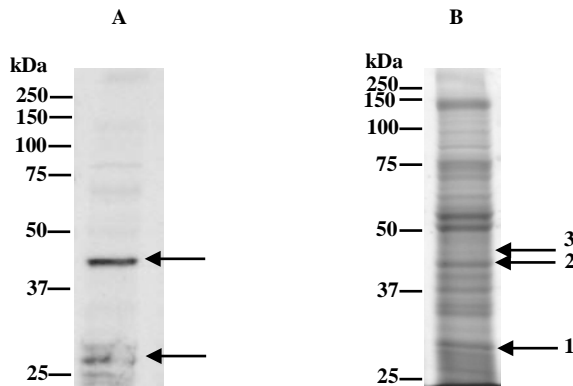


Figura 26.- Proteínas del epitelio intestinal de *L. decemlineata* eluidas de una matriz con calmodulina inmovilizada. A) Inmunodetección de la unión de la toxina Cry3Aa a las proteínas eluidas, las flechas indican bandas de 44 y 28 kDa en las cuales se detectó la unión de Cry3Aa con elevada intensidad. B) Tinción con azul de Coomassie de las proteínas eluidas separadas por SDS-PAGE, las flechas indican las bandas analizadas por espectrometría de masas y su número de identificación.

La identificación se realizó enviando la información de MS/MS a la base de datos NCBI nr (restricción taxonómica insectos, taxid: 6960) usando el algoritmo de búsqueda MASCOT (MatrixScience, UK). Para las tres bandas analizadas, el valor límite de *score* a partir del cual se consideró la homología estadísticamente significativa fue de 54. En la tabla 4 se muestra la información obtenida mediante el análisis por espectrometría de masas.

No.	No. Acceso NCBI	Descripción	Especie	Mascot Score	M (kDa)	Péptidos Identificados
1	NP_511052	Actina 5C, isoforma B	<i>D. melanogaster</i>	375	42,19	30
	XP_967480	Similar a canal dependiente de voltaje selectivo a aniones, isoforma 1	<i>T. castaneum</i>	127	38	3
	XP_976150	Similar a canal dependiente de voltaje selectivo a aniones, isoforma 2	<i>T. castaneum</i>	127	30,36	3
	NP_001165863	Similar a proteína ribosomal S3	<i>T. castaneum</i>	99	26,81	3
2	AAAY88916	Actina	<i>C. pipiens pipiens</i>	603	42,07	30
	XP_623673	Similar a isocitrato deshidrogenasa isoforma C, isoforma 2	<i>A. mellifera</i>	169	47,02	8
3	XP_971634	Similar a proteína ribosomal L4e	<i>T. castaneum</i>	171	45,61	9
	XP_967480	Similar a canal dependiente de voltaje selectivo a aniones, isoforma 1	<i>T. castaneum</i>	119	38	20
	XP_976150	Similar a canal dependiente de voltaje selectivo a aniones, isoforma 2	<i>T. castaneum</i>	119	30,36	20
	AAF29858	Factor-1 alfa de elongación	<i>S. minutus</i>	93	34	3
	XP_970124	Similar a citrato sintasa	<i>T. castaneum</i>	90	51,76	4
	NP_609792	CaBP1 (Familia PD1a, subfamilia P5)	<i>D. melanogaster</i>	56	47,18	1

Tabla 4.- Proteínas del epitelio intestinal de *L. decemlineata* eluidas de una matriz con calmodulina inmovilizada. Se muestra el número identificativo de cada mancha analizada, el número de acceso en la base de datos NCBI de las proteínas identificadas, su descripción, la especie a la que pertenecen, el *score* máximo en Mascot, sus masas moleculares calculadas y el número de péptidos identificados para cada una.

Según los resultados de espectrometría de masas, la mejor asignación para la banda 1 corresponde a una proteína con homología a la isoforma B de actina 5C de *D. melanogaster* con un valor de *score* en Mascot de 375. Igualmente, con menores valores de *score*, en esta banda se identificaron proteínas similares a las isoformas 1 y 2 de un canal dependiente de voltaje selectivo a aniones de *T. castaneum* y una proteína similar a la proteína ribosomal S3 de *T. castaneum*.

Para la banda 2 la mejor asignación también corresponde a una proteína con homología a actina de *Culex pipiens pipiens*, con un valor de *score* en Mascot de 603. En esta banda también se identificó una proteína similar a la isoforma 2 de isocitrato deshidrogenasa de *A. mellifera* con un valor de *score* en Mascot de 169.

En la banda 3 se identificó una proteína similar a la proteína ribosomal L4e de *T. castaneum* con un valor de *score* en Mascot de 171. En esta banda también se identificaron proteínas similares a las isoformas 1 y 2 de un canal dependiente de voltaje selectivo a aniones de *T. castaneum*, a la proteína Factor-1 alfa de elongación de *Scalymphorus minutus*, a citrato sintasa de *T. castaneum* y a la proteína CaBP1 de *D. melanogaster*.

Tal y como se aprecia en la Tabla 4, entre las proteínas del epitelio intestinal de *L. decemlineata* eluidas de una matriz con calmodulina inmovilizada y a las que se unió Cry3Aa, se identificó fundamentalmente actina. En el apartado 1.4.4.2 (Tabla 3) se había identificado actina entre proteínas de BBMV de *L. decemlineata* que quedaron retenidas en una matriz que contenía al péptido pep-rec inmovilizado, lo cual podría sugerir que la regulación del procesado proteolítico de Cry3Aa por calmodulina también podría tener lugar a través de la interacción indirecta entre Cry3Aa y actina mediada por calmodulina.

2- Interacción de Cry3Aa con proteínas de microdominios de la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata*

2.1- Aislamiento de microdominios de membrana de células disociadas del epitelio intestinal de *L. decemlineata*

Los *lipid rafts* constituyen la puerta de entrada a células de mamíferos para algunas toxinas bacterianas (Wolf *et al.*, 1998; Herreros *et al.*, 2001) y se ha sugerido que la integridad de dichos microdominios es esencial para la toxicidad generada por las toxinas Cry1A en determinados lepidópteros (Zhuang *et al.*, 2002). La localización de los receptores de las toxinas Cry de Bt tanto en los *lipid rafts*, como en las regiones *non-rafts* de la membrana plasmática (revisado en Soberón *et al.*,

2009) sugiere que la interacción de estas toxinas con ambas regiones de la membrana podría ser clave para su modo de acción.

Con el objetivo de analizar la interacción de Cry3Aa con las regiones *rafts* y *non-rafts* de la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata*, llevamos a cabo su separación en células dissociadas del epitelio intestinal (MEC). Para ello, las MECs se incubaron con el detergente Tritón X-100 a 4°C y las regiones insolubles en detergente, que contenían los *lipid rafts*, se separaron de las fracciones solubles (*non-rafts*) utilizando un gradiente de densidad de sacarosa. Tras la ultracentrifugación, las proteínas contenidas en cada una de las fracciones del gradiente fueron separadas por SDS-PAGE e inmobilizadas en una membrana. La proteína fasciclina anclada a GPI, que es un marcador de *lipid rafts*, se detectó fundamentalmente en la fracción 2 del gradiente, recogida justo en la interfase entre las soluciones de 35 y 5% de sacarosa, indicando la presencia de los *lipid rafts* en dicha fracción (Figura 27A y B). Las regiones solubles se localizaron en las fracciones 5 y 6, recogidas en la interfase entre las soluciones de 35 y 42,5% de sacarosa y del fondo del tubo, respectivamente, y en ellas se detectó la isoforma transmembrana de fasciclina, marcador de regiones de membrana *non-raft* (Figura 27A y C).

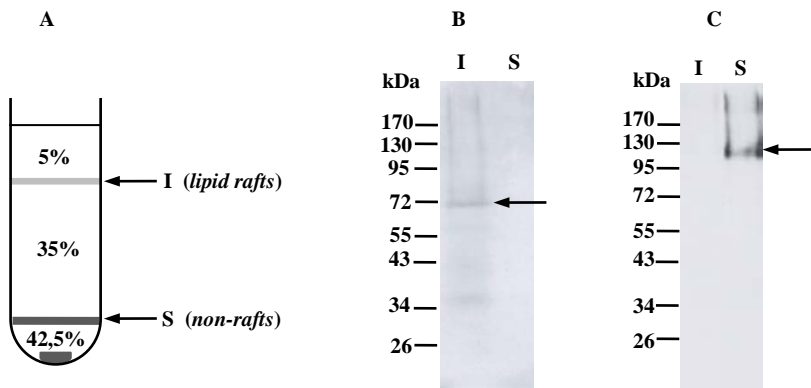


Figura 27.- Aislamiento de fracciones de MECs de *L. decemlineata* insolubles (I) y solubles (S) en Tritón X-100 en un gradiente de densidad de sacarosa. A) Esquema de la separación en gradiente de sacarosa, se indican los porcentajes de sacarosa utilizados y se señalan con flechas la localización en el gradiente de las fracciones insoluble (gris claro) y soluble (gris oscuro) de las MECs. Inmunodetección de las proteínas fasciclina anclada a GPI (B) y transmembrana (C) en fracciones idénticas aisladas del gradiente. Las flechas indican las proteínas fasciclina-GPI de 70 kDa (B) y fasciclina transmembrana de 123 kDa (C), respectivamente.

2.2- Unión de Cry3Aa a microdominios de membrana de células dissociadas del epitelio intestinal de *L. decemlineata*

Se analizó la unión de la toxina Cry3Aa a las proteínas inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa correspondientes a la fracción insoluble (*lipid rafts*) y a una de las fracciones solubles de membrana (fracción 5). La inmunodetección de la unión de Cry3Aa mostró que la toxina se unió fundamentalmente a la fracción soluble, en particular a una banda de 36 kDa y a proteínas de alrededor de 200 kDa (Figura 28A, carrera S). En la fracción insoluble se inmunodetectó la unión de Cry3Aa a una banda de 36 kDa con elevada intensidad (Figura 28A, carrera I).

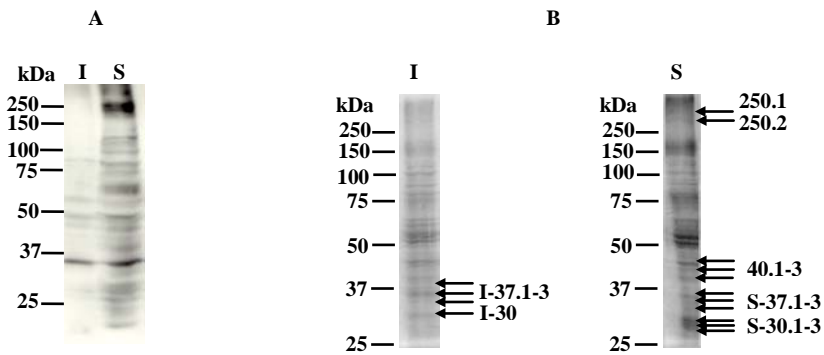


Figura 28.- Proteínas de las fracciones insoluble y soluble de las MECs a las que se unió la toxina Cry3Aa. Inmunodetección de la unión de la toxina Cry3Aa a las proteínas de las fracciones insoluble y soluble inmovilizadas en una membrana de PVDF (A). Tinción con azul de Coomassie de las proteínas de las fracciones insoluble y soluble separadas por SDS-PAGE (B). Se señalan las bandas cortadas para ser analizadas por espectrometría de masas. En el panel B las carreras I y S se muestran separadas porque no eran carreras contiguas en el gel.

Con el objetivo de identificar las proteínas a las que se unió la toxina, tanto en la fracción que contenía los *lipid rafts* como en la fracción soluble, se analizaron 12 bandas por espectrometría de masas, en los rangos de masas moleculares de entre 25 y 37 kDa y de alrededor de 250 kDa, que corresponden a las masas moleculares aparentes de las bandas de las fracciones insoluble y soluble de las MECs en las que se inmunodetectó la unión de Cry3Aa con mayor intensidad. Además se analizaron 3 bandas de aproximadamente 40 kDa de la fracción soluble, puesto que

tanto en dicha fracción como en el apartado 1.4.4.3 (Figura 26A) habíamos detectado la unión de Cry3Aa a bandas de masa molecular aproximada a dicho valor.

De manera análoga a como se procedió anteriormente, las manchas escindidas del gel monodimensional (Figura 28B) se digirieron con tripsina y se analizaron por espectrometría de masas. Las bandas 40.1, 40.2, S-30.1 y S-30.2 se analizaron por huella peptídica MS-MS/MS (MALDI TOF/TOF) y el resto por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS/MS). Para la identificación se utilizó la base de datos NCBI nr (restricción taxonómica a insectos) usando el algoritmo de búsqueda MASCOT (MatrixScience, UK). En la Tabla 5 se indica la información referente a las proteínas identificadas, en la primera parte se muestra la información correspondiente a las proteínas de la fracción que contenía los *lipid rafts* o fracción insoluble, seguida por la información obtenida para las proteínas de la fracción soluble (*non-rafts*).

No.	No. Acceso NCBI	Mascot Score	Definición	M (kDa)	Péptidos Identificados	Especie
Fracción Insoluble (<i>Rafts</i>)						
I-37.1	XP_397306	247	Similar a Transaldolasa 1	36,24	6	<i>A. mellifera</i>
	XP_966771	142	Similar a receptor mitocondrial Tom40	34,49	3	<i>T. castaneum</i>
	ABM55485	134	Cisteína proteasa digestiva intestinal D-5	36,76	3	<i>L. decemlineata</i>
	EEB12070	127	Malato deshidrogenasa	37,50	2	<i>P. humanus corporis</i>
	XP_976064	88	Similar a ribosa-fosfato pirofosfoquinasa	38,12	3	<i>T. castaneum</i>
I-37.2	XP_975007	415	Similar a glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	39,46	9	<i>T. castaneum</i>
	XP_974101	311	Prohibitina-2	36,04	7	<i>T. castaneum</i>
	XP_970675	303	Similar a la subunidad alfa del complejo asociado al polipéptido naciente	22,72	6	<i>T. castaneum</i>
	XP_970131	240	Similar a la subunidad beta de la proteína de unión de nucleótidos de guanina	37,95	5	<i>T. castaneum</i>

	XP_397306	191	Similar a transaldolasa 1	36,24	4	<i>A. mellifera</i>
	CAD58931	184	Similar a proteína ribosomal ácida PO	34,09	4	<i>T. balearica</i>
	XP_001659012	167	Malato deshidrogenasa	45,04	3	<i>A. aegypti</i>
	AAS20591	161	Cisteína proteasa digestiva intestinal B-11	36,67	5	<i>L. decemlineata</i>
	XP_001844836	130	Aldehído reductasa 1	35,68	3	<i>C. quinquefasciatus</i>
	XP_966482	124	Similar a proteína hipotética conservada	28,9	3	<i>T. castaneum</i>
	XP_973445	114	Similar a lectina vesicular de unión a manosa	37,28	2	<i>T. castaneum</i>
	AAK51552	86	Receptor para la proteína quinasa C activada (RACK1)	36,48	2	<i>H. virescens</i>
I-37.3	BAD52259	516	Homólogo de RACK1	36,37	13	<i>P. xylostella</i>
	ABC61672	152	Flavoproteína de transferencia de electrones subunidad alfa	35,26	4	<i>P. americana</i>
	XP_967051	131	Pirofosfatasa	32,74	4	<i>T. castaneum</i>
	XP_968656	113	Similar a homólogo de CAAX prenil proteasa 1	50,02	3	<i>T. castaneum</i>
	XP_967931	99	Similar a anexina IX	36,03	3	<i>T. castaneum</i>
I-30	XP_967480	185	Similar a canal dependiente de voltaje selectivo a aniones isoforma 1	38	5	<i>T. castaneum</i>
Fracción Soluble (non-Rafts)						
250.1	XP_973750	2272	Similar a espectrina	282,64	52	<i>T. castaneum</i>
250.2	XP_001813466	3251	Similar a miosina (cadena pesada)	224,57	67	<i>T. castaneum</i>
40.1	XP_393368	219	Similar a actina-5C isoforma 1	42,12	24	<i>A. mellifera</i>
40.2	ABZ10961	102	Arginina quinasa	40,28	16	<i>P. striolata</i>
40.3	ABZ10961	686	Arginina quinasa	40,28	14	<i>P. striolata</i>
	XP_974905	308	Similar a subunidad de 40 KDa de V-ATPasa	40,25	6	<i>T. castaneum</i>
	XP_970150	262	Similar a la subunidad alfa 2 de la proteína de transporte Sec61	52,58	6	<i>T. castaneum</i>
	XP_001352282	212	ATP sintasa subunidad β	54,32	4	<i>D. pseudoobscura pseudoobscura</i>
	XP_623502	145	Letal, isoforma 1	45	6	<i>A. mellifera</i>

	XP_001949530	118	Similar a piruvato deshidrogenasa	36,7	4	<i>A. pisum</i>
	EFA04932	113	Fructosa 1,6-bifosfato aldolasa	40,12	2	<i>T. castaneum</i>
S-37.1	XP_974101	131	Prohibitina-2	36,04	19	<i>T. castaneum</i>
S-37.2	XP_970163	252	Similar a piruvato deshidrogenasa	39,41	7	<i>T. castaneum</i>
	EEZ97412	232	Proteína hipotética	34,32	6	<i>T. castaneum</i>
	XP_311527	152	Piruvato deshidrogenasa (E1-PDHc)	38,65	4	<i>A. gambiae</i>
	AAK51552	106	RACK1	36,48	3	<i>H. virescens</i>
	XP_974101	100	Prohibitina-2	36,04	2	<i>T. castaneum</i>
	XP_968561	88	Similar a translocasa de nucleótidos de adenina	32,28	2	<i>T. castaneum</i>
S-37.3	XP_968064	423	Similar a la proteína ribosomal S3Ae	30	10	<i>T. castaneum</i>
	XP_001959032	309	Proteína transportadora mitocondrial	40,79	11	<i>D. ananassae</i>
	ABU68467	259	Translocasa de nucleótidos de adenina	33,35	6	<i>M. alternatus</i>
	XP_966490	114	Succinil-CoA sintetasa	35,05	3	<i>T. castaneum</i>
	CAA28192	99	Actina A3		1	<i>B. mori</i>
	XP_001601256	63	Similar a Anexina IX-A	36,14	1	<i>N. vitripennis</i>
	XP_623470	62	Similar a tropomiosina	39,79	2	<i>A. mellifera</i>
S-30.1	XP_001848603	85	Prohibitina-1	30	10	<i>C. quinquefasciatus</i>
S-30.2	XP_968561	158	Similar a translocasa de nucleótidos de adenina	33,28	20	<i>T. castaneum</i>
S-30.3	ABU68467	381	Similar a translocasa de nucleótidos de adenina	33,35	9	<i>M. alternatus</i>
	XP_972721	337	Similar a cadena gamma de ATP sintasa mitocondrial	32,28	9	<i>T. castaneum</i>
	ACY71283	289	Proteína ribosomal S4	29,58	6	<i>C. tremulae</i>
	XP_001864030	268	Proteína transportadora de tricarbóxilatos mitocondrial	35,15	10	<i>C. quinquefasciatus</i>
	P31402	223	V-ATPasa subunidad E	26,13	6	<i>M. sexta</i>

Tabla 5.- Proteínas de las fracciones insoluble y soluble de las MECs de *L. decemlineata* a las que se unió Cry3Aa. Se muestra el número identificativo de cada banda analizada, la fracción en la que fueron aisladas, el número de acceso de las proteínas identificadas en la base de datos NCBIInr, su descripción, la especie a la que pertenecen, el *score* máximo en Mascot, sus masas moleculares calculadas y el número de péptidos identificados.

Fracción Insoluble (*lipid rafts*)

En los péptidos de la banda I-37.1 se encontró homología con varias proteínas, siendo el valor límite de *score* a partir del cual se consideró la homología estadísticamente significativa de 56. La asignación de mayor *score* en Mascot (247) corresponde a una proteína de *A. mellifera* similar a transaldolasa 1 de la cual se identificaron 6 péptidos. Igualmente se encontró homología con el receptor mitocondrial Tom 40 de *T. castaneum* con *score* en Mascot de 142, se identificó la cisteín proteasa digestiva intestinal D-5 de *L. decemlineata* con *score* en Mascot de 134, la cual ya había sido identificada en el apartado 1.4.1 como proteína capaz de unir la toxina Cry3Aa, se encontró similitud con malato deshidrogenasa de *Pediculus humanus corporis* con *score* en Mascot de 127 y con ribosa-fosfato pirofosfoquinasa de *T. castaneum* con *score* en Mascot de 88.

En la banda I-37.2 también se encontró homología con varias proteínas (valor límite de *score* 56). La asignación con mayor valor de *score* en Mascot (415) corresponde a una proteína de *T. castaneum* similar a glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa de la que se identificaron 9 péptidos. En dicha banda también se identificó una proteína homóloga a prohibitina-2 de *T. castaneum* con *score* en Mascot de 311, una proteína similar a la subunidad alfa de la proteína asociada al polipéptido naciente de *T. castaneum* con *score* en Mascot de 303, una proteína similar a la subunidad beta de una proteína que une nucleótidos de guanina de *T. castaneum*, con *score* en Mascot de 240, una proteína similar a transaldolasa 1 de *A. mellifera* con *score* en Mascot de 191, una proteína similar a una proteína ribosomal ácida del coleóptero *Timarcha baleárica* con *score* en Mascot de 184 y una proteína homóloga a malato deshidrogenasa de *A. aegypti* con *score* en Mascot de 167, se identificó la cisteín proteasa digestiva intestinal B-11 de *L. decemlineata* con *score* en Mascot de 161, se encontró homología con aldehído reductasa 1 de *C. quinquefasciatus* con *score* en Mascot de 130, con una proteína hipotética conservada de *T. castaneum* con *score* en Mascot de 124, una proteína de *T. castaneum* similar a lectina vesicular de unión a manosa con *score* en Mascot de 114 y con el receptor de la proteína quinasa C activada (RACK1) de *Heliothis virescens* con *score* en Mascot de 86.

En la banda I-37.3 se encontró homología (límite de *score* 55) con las proteínas receptor de la proteína quinasa C activada de *Plutella xylostella*, con un elevado *score* en Mascot de 516, con la subunidad alfa de la flavoproteína de transferencia de electrones de *Periplaneta americana* con *score* en Mascot de 152, con pirofosfatasa de *T. castaneum* con *score* en Mascot de 131, con prenil proteasa 1 CAAX de *T. castaneum* con *score* en Mascot de 113 y con anexina IX de *T. castaneum* con *score* en Mascot de 99.

La mejor asignación para la banda I-30 corresponde a una proteína con homología a la isoforma 1 de un canal dependiente de voltaje selectivo a aniones de *T. castaneum*, con un *score* en Mascot de 185, siendo el valor límite de *score* de 55.

Fracción Soluble (*non-rafts*)

En las bandas 250.1, 250.2, 40.1, 40.2, S-37.1, S-30.1 y S-30.2 de la fracción soluble se encontró homología sólo con una proteína por cada banda analizada.

En la banda 250.1 se identificaron 52 péptidos con homología a espectrina de *T. castaneum*, con un *score* máximo en Mascot de 2272 (*score* límite de 55) y en la banda 250.2 se identifican 67 péptidos con un *score* en Mascot de 3251 con homología a una proteína de *T. castaneum* similar a la cadena pesada de miosina, en ambos casos el valor límite de *score* fue de 56.

La banda 40.1 corresponde a una proteína similar a la isoforma 1 de actina 5C de *A. mellifera* con un *score* en Mascot de 219 y la Banda 40.2 a una proteína similar a arginina quinasa del coleóptero *Phyllotreta striolata* con *score* en Mascot de 102 (*score* límite de 82 para ambas).

En la banda S-37.1 se identificaron 19 péptidos con homología a la proteína prohibitina-2 de *T. castaneum* con *score* en Mascot de 131, con dicha proteína también habíamos encontrado homología en la banda I-37.2 de la fracción insoluble. En la banda S-30.1 se identificaron 10 péptidos con homología a prohibitina-1 de *T. castaneum*, la cual pertenece a la misma familia de proteínas que prohibitina-2. El valor de *score* máximo en Mascot fue de 85 y en esta banda también se encontró homología con prohibitina-1 de los insectos *A. gambiae*, *N. vitripennis*, *Acyrtosiphon pisum* y *Bombyx mori*. Tanto en la banda S-37.1 como

en la S.30.2 el valor de *score* a partir del cual se consideró la homología estadísticamente significativa fue 82.

En la banda S-30.2 (*score* mínimo de 82) se identificó una proteína similar a translocasa de nucleótidos de adenina de *T. castaneum* con *score* en Mascot de 158.

En la banda 40.3 encontramos una mezcla de proteínas y el valor límite de *score* fue de 56. La asignación de mayor *score* (686) corresponde a una proteína con homología a arginina quinasa de *P. striolata*, igualmente se encontró homología con la subunidad de 40 kDa de V-ATPasa de *T. castaneum* con *score* en Mascot de 308, con la subunidad alfa 2 de la proteína de transporte Sec61 de *T. castaneum* con *score* de 262, con la subunidad beta de ATP sintasa de *Drosophila pseudoobscura pseudoobscura* con *score* en Mascot de 212, con la proteína letal 1 de *A. mellifera* con *score* en Mascot de 145, con una proteína de *A. pisum* similar a piruvato deshidrogenasa con *score* de 118 y con la proteína fructosa 1,6-bifosfato aldolasa de *T. castaneum* con *score* en Mascot de 113.

En la banda S-37.2 (*score* mínimo de 56) la asignación de mayor *score* (252) corresponde a una proteína similar a piruvato deshidrogenasa de *T. castaneum*, igualmente se encontró homología con una proteína hipotética de *T. castaneum* con *score* en Mascot de 232, con la proteína piruvato deshidrogenasa de *A. gambiae* con *score* en Mascot de 152, con el receptor para la proteína quinasa C activada RACK1 de *H. virescens* con *score* en Mascot de 106, con prohibitina-2 de *T. castaneum* con *score* en Mascot de 100 y con una proteína de *T. castaneum* similar a translocasa de nucleótidos de adenina con *score* en Mascot de 88.

Para la mezcla de proteínas de la banda S-37.3 (*score* mínimo de 56) la asignación de mayor *score* (423) corresponde a una proteína similar a la proteína ribosomal S3Ae de *T. castaneum*, además se encontró homología con una proteína transportadora mitocondrial de *Drosophila ananassae* con *score* en Mascot de 309, con la proteína translocasa de nucleótidos de adenina de *Monochamus alternatus* con *score* en Mascot de 259, con la proteína succinil CoA sintetasa de *T. castaneum* con *score* en Mascot de 114, con actina A3 de *B. mori* con *score* en Mascot de 99, con una proteína de *N. vitripennis* similar a anexina IX-A con *score*

en Mascot de 63 y con una proteína de *A. mellifera* similar a tropomiosina con *score* en Mascot de 62.

La banda S-30.3 (*score* mínimo de 56) es una mezcla de proteínas en la que la asignación de mayor *score* en Mascot (381) corresponde a una proteína similar a translocasa de nucleótidos de adenina de *M. alternatus*, igualmente se identificaron proteínas con similitud a la cadena gamma de ATP sintasa mitocondrial de *T. castaneum* con *score* en Mascot de 337, a la proteína ribosomal S4 de *Chrysomela tremulae* con *score* en Mascot de 289, a una proteína mitocondrial transportadora de tricarboxilatos de *C. quinquefasciatus* con *score* en Mascot de 268 y a la subunidad E de V-ATP sintasa de *Manduca sexta* con *score* en Mascot de 223.

El análisis de las proteínas identificadas en las fracciones soluble e insoluble de las MECs (Tabla 5), evidencia que en ambas fracciones se localizan proteínas que habían sido previamente identificadas por espectrometría de masas como proteínas del epitelio intestinal de *L. decemlineata* a las que se unió la toxina Cry3Aa. Entre ellas se encuentran las cisteín proteasas digestivas intestinales D-5 (apartado 1.4.1 y 1.4.2) y B-11 (apartado 1.4.2) y una proteína similar a la isoforma 1 de un canal dependiente de voltaje selectivo a aniones de *T. castaneum* (apartado 1.4.4.3) ambas localizadas en la fracción que contenía los *lipid rafts*. En la fracción soluble se encontró actina, previamente identificada en los apartados 1.4.4.2 y 1.4.4.3 y la proteína prohibitina-1 que ya había sido identificada en el apartado 1.4.2, en la mancha correspondiente a una proteína de las BBMV de *L. decemlineata* que interactuó con Cry3Aa.

En relación a la proteína prohibitina-1, tanto en la mancha 7 del apartado 1.4.2 como en la banda S-30.1 localizada en la fracción soluble de membrana se identificaron un gran número de péptidos con homología a proteínas ortólogas de prohibitina-1 presentes en los insectos *T. castaneum*, *A. gambiae*, *C. quinquefasciatus*, en varias especies del género *Drosophila*, en *B. mori*, *A. aegypti*, *N. vitripennis* y *A. pisum*, así como de la proteína letal 2 de *D. melanogaster* y *A. mellifera*, todas pertenecientes a la misma familia de proteínas. Según se aprecia en la Figura 29, existe una elevada conservación de la estructura primaria de dichas proteínas, lo cual sugiere que en *L. decemlineata* también podría existir una proteína con estructura similar.


```

Tca      RIEAAED IAYQLSRSRQVSYLPGGQNLNLLNVPTPSN- 276
Bmo      RIEAAED IAYQLAKSRNVTYLPHGQVLLNLPQN-- 274
Nvi      RIEAAED IAYQLGRSRQVIYLPFGQSTLLSLPQ--- 272
Dme      RIEAAED IAYQLSRSRGVAYLPSGQSTLLNLPSTIAQ 276
Dgr      RIEAAED IAYQLSRSRGVAYLPSGQSTLLNLPSTIAQ 276
Dvi      RIEAAED IAYQLSRSRGVAYLPSGQSTLLSLPSNMGQ 276
Dps      RIEAAED IAYQLSRSRGVAYLPSGQSTLLNLPSTIAQ 276
Dmo      RIEAAED IAYQLSRSRGVAYLPSGQSTLLNLPSTIAQ 276
Dwi      RIEAAED IAYQLSRSRGVAYLPSGQSTLLNLPSTIAQ 276
Dan      RIEAAED IAYQLSRSRGVAYLPSGQSTLLNLPSTIAQ 276
Cqu1     RIEAAED IAYQMSRSRGVAYLPAGQTTLLNLPQ--- 272
Cqu2     RIEAAED IAYQMSRSRGVAYLPAGQTTLLNLPQ--- 272
Aae      RIEAAED IAYQMSRSRGVAYLPAGQTTLLQLPQ--- 272
Aga      RIEAAED IAYQMSRSGVNYLPAGQTTLLSLPQ--- 272
Ame2     RIEAAED IAHNLSRSRQVAYLPPGQNVLLNLPQ--- 271
Api      RIEAAED IAYQLSRSRQVSYFPPGQNLNLPQAQ--- 273
*****:::.* * * * * * * * * * * * * *

```

Figura 29.- Alineamiento de las estructuras primarias de prohibitina-1 de varios insectos y letal-2 de *A. mellifera* (Ame2) y *D. melanogaster* (Dme). Los péptidos representados en rojo corresponden a los identificados por espectrometría de masas en la banda 7 del apartado 1.4.2, en azul los identificados en la banda S-30.1 del presente apartado y en verde los identificados en ambos ensayos. El alineamiento se llevó a cabo usando el programa CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>). Las secuencias de prohibitina-1 mostradas corresponden a los insectos *T. castaneum* (Tca), *B. mori* (Bmo), *N. vitripennis* (Nvi), *C. quinquefasciatus* (Cqu1 y Cqu2), *A. aegypti* (Aae), *A. gambiae* (Aga), *A. pisum* (Api) y a insectos de las especies de *Drosophila grimshawi* (Dgr), *virilis* (Dvi), *pseudoobscura* (Dps), *mojavensis* (Dmo), *willistoni* (Dwi) y *ananassae* (Dan).

En las bandas I-37.2 y S-37.1 de las fracciones insoluble y soluble, respectivamente, se identificaron un gran número de péptidos similares a la proteína prohibitina-2 de *T. castaneum* (Figura 30). En la banda 40.3 de la fracción soluble se identificaron dos péptidos con homología a la proteína letal 1 de *A. mellifera*, perteneciente a la misma familia que prohibitina-2, aunque la conservación de sus secuencias aminoacídicas es baja.

```

1 MAQSKLNDLAGKFGKGGPPLGLGLKLLAVGGAAAYGISQAMYTEGGHR
51 AIMFNRIIGVQKDIYTEGLHFRVWFQYPIIYDIRSRPRKISSPTGSKDL
101 QMVNISLRLVLSRPNASQLPIVYRQLGLDYDEKVLPSICNEVLKSVVAKFN
151 AAQLITQRQQVSLVRRRELTERRARDFNIILDDVSIITELSFGEYTAAVEA
201 KQVAQQEAQRAAFIVEKAKQERQKIVQAEGEAEAAKMLGEAISKNPGYL
251 KLRKIRAAQNISRTIANSQNKVYLSGNSMLNLSDKFDDQSKLKRNEY
301 DDTTRSADKNVLRITARKMATRIAG

```

Figura 30.- Secuencia aminoacídica de la proteína prohibitina-2 de *T. castaneum*. Los péptidos identificados por espectrometría de masas se señalan en color rojo

Dado que las prohibitinas están implicadas en numerosas rutas de señalización celular y en la interacción con componentes estructurales de patógenos relacionada con la generación de virulencia en la célula huésped y no han sido descritas en *L. decemlineata*, nos planteamos profundizar en el estudio de la unión de la toxina Cry3Aa a prohibitinas localizadas en el epitelio intestinal de *L. decemlineata*.

2.2.1- Inmunodetección de las proteínas prohibitina-1 y -2 de *L. decemlineata*

Para confirmar la presencia de las proteínas prohibitina-1 y -2 en la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata* nos propusimos inmunodetectarlas en las proteínas de las fracciones de membrana insoluble y soluble de las MECs, inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa. Para ello, empleamos el anticuerpo Prohibitin (H-80) (Santa Cruz) generado contra la región comprendida entre los aminoácidos 193 y 272 del extremo C-terminal de la prohibitina-1 humana. Dicha región se encuentra altamente conservada en las prohibitina-1 de *T. castaneum* y *C. quinquefasciatus*, identificadas en la mancha 7 del apartado 1.4.2 y en la banda S-30.1 de la fracción soluble de las MECs. Aunque en la proteína prohibitina-2 de *T. castaneum* el grado de conservación en esta región es menor, igualmente existen un gran número de aminoácidos conservados (Figura 31).

```

Phb1Tc      DDISITHLTFGREFTLAVELKQVAQOEAEKARFLVEKAEQNKKAAVISAEGDAQAATLLA 226
Phb1Cq      DDISITHLTFGKEFTQAVEMKQVAQOEAEKARFVMEKAEQMKQAAIVSAEGDAEAALLA 225
Phb1Hs      DDVSLTHLTFGKEFTQAVEAKQVAQOEAEERARFVVEKAEQKKAALISAEGDSKAAELIA 225
Phb2Tc      DDVSIITELSPGKEYTAAVEAKQVAQOEQRRAAFIVEKAKQERQKIVQAEGEAEAAKMLG 240
          ***:*:*:**:* ** * *****:* * :*****: * : : :*****:*** : :

Phb1Tc      KAFGDAGEGLVELRRIEAAEDIAYQLSRSRQVSYLFGGQNLNLPVTPSN----- 276
Phb1Cq      KSPGDSGDGLVELRRIEAAEDIAYQMSRSRGVAYLPAQQTLLNLPQ----- 272
Phb1Hs      NSLATAGDGLIELRKLKLEAAEDIAYQLSRRNITVLPAGQSVLLQLFPQ----- 272
Phb2Tc      EAISK-NPGYLKLRKIRAAQNIISRTIANSQNKVYLSGNLMLNINISDFDDQSDKLRNE 299
          : : : . . * :*****:*****: : : : * : * : * . . . . *

```

Figura 31.- Alineamiento de las secuencias C-terminal de las proteínas prohibitina-1 de *H. sapiens*, *T. castaneum*, *C. quinquefasciatus* y prohibitina-2 de *T. castaneum*. En color rojo se señalan los aminoácidos que están totalmente conservados en relación a la secuencia de la proteína de humanos. El alineamiento se llevó a cabo utilizando el programa CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>)

Tal y como se observa en la Figura 32, en la fracción soluble de las MECs se inmunodetectó una banda con una masa molecular aparente de 29 kDa, valor que se aproxima a la masa molecular calculada de las proteínas prohibitina-1 de *T. castaneum* y *C. quinquefasciatus* (30 kDa) y a la masa molecular aparente de la banda I-30.1 de la fracción soluble de la membrana de las MECs, en la que se identificaron un gran número de péptidos con homología a proteínas prohibitina-1 de varios insectos. Dicha banda también se detectó en la fracción insoluble, aunque con menor intensidad. La señal de baja intensidad obtenida en ambas fracciones, aproximadamente a 34 kDa podría corresponder a la prohibitina-2, identificada en las bandas I-37.2 y S-37.1 de las fracciones insoluble y soluble, respectivamente. Es necesario señalar que además de las bandas mencionadas, en la Figura 32 se observan otras bandas de proteínas que podrían corresponder a agregados formados

por las prohibitinas-1 y -2, o a interacciones inespecíficas de los anticuerpos con otras proteínas de las MECs. Dado que en ausencia del anticuerpo anti-prohibitina-1, con el anticuerpo secundario no se detectó banda alguna, la aparición de dichas bandas podría deberse al reconocimiento inespecífico de proteínas de BBMV por el anticuerpo anti-prohibitina-1.

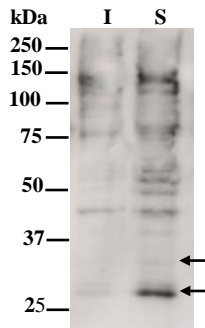


Figura 32.- Presencia de la proteína prohibitina-1 en las fracciones de membrana de las MECs de *L. decemlineata*. Inmunodetección de prohibitina-1 en las fracciones insoluble (I) y soluble (S) de las MECs con un anticuerpo generado contra la prohibitina-1 humana. Las flechas señalan bandas de 29 y 34 kDa que podrían corresponder a las prohibitina-1 y -2 de *L. decemlineata*, respectivamente.

Estos resultados corroboran la presencia de una proteína homóloga a prohibitina-1 en *L. decemlineata* a la que se une la toxina Cry3Aa, cuya secuencia nucleotídica nos propusimos identificar en este insecto.

2.2.2- Aislamiento del gen de la proteína prohibitina-1 de *L. decemlineata*

Para la amplificación del gen de prohibitina-1 de *L. decemlineata* se diseñaron cebadores degenerados partiendo de la información procedente de la secuencia nucleotídica de los genes que codifican para las prohibitina-1 de insectos de las que se habían identificado un elevado número de péptidos en proteínas del epitelio intestinal de *L. decemlineata* (Figura 29). Se sintetizaron 4 oligonucleótidos a partir de las secuencias S₈₃KDLQNV₈₉, I₉₁TLRIL₉₆, V₁₈₄ELKQVA₁₉₀ e I₂₄₂EAAEDI₂₄₈ (posiciones en prohibitina-1 de *T. castaneum*), identificadas por espectrometría de masas y altamente conservadas en las estructuras primarias de las prohibitina-1 en

dichos insectos. Se llevaron a cabo amplificaciones por PCR, empleando los oligonucleótidos diseñados y ADNc de *L. decemlineata*.

Con la pareja de oligonucleótidos S₈₃KDLQNV₈₉ e I₂₄₂EAAEDI₂₄₈ y el par I₉₁TLRIL₉₆ e I₂₄₂EAAEDI₂₄₈, se amplificaron dos fragmentos de ADN con tamaños similares a los esperados según las posiciones correspondientes de los oligonucleótidos en los genes de prohibitina-1 de insectos, a partir de los cuales fueron diseñados. Con las secuencias de los fragmentos amplificados se llevaron a cabo búsquedas de homología con otras secuencias nucleotídicas de insectos en la base de datos no redundante “Colección de Nucleótidos (nt/nr)” del NCBI, utilizando el programa BLASTn 2.2.24 (Altschul *et al.*, 1997). Con ambos fragmentos se encontró homología con un gran número de genes de prohibitina-1 de insectos.

El análisis minucioso de las secuencias amplificadas evidenció que ambas pertenecían a una única secuencia, la cual correspondería a un fragmento del gen de prohibitina-1 de *L. decemlineata*. La secuencia nucleotídica de dicho fragmento consta de 397 pb (Figura 33).

```
CCAGACGAGCTTCCGAATATACACTATCCTAGGTCAGGACTACGAAGAAAGAGTACTAC
CATCGATCCCCTGAAGTTCTCAAAGCCGTAGTAGCTCAGTTTGACGCAGGAGAACTGA
TCACCCAGCGTGACTTGGTATCACAAAAAGTCAGTGATGATCTGACAGAAAAGCGGGA
CAATTTGGTGTGATCCTAGACGACATTTCTTTAACACATTTAACATTCGGTAGAGAGTT
TACACAGGCTGTTGAACTGAAACAAGTTGCACAACAGGAAGCAGAAAAAGCTAGATTCT
TGGTAGAGAAGGCAGAACAGACCAAAAAAGCAACAATTCTCTCAGCTGAAGGTGATGCC
CAAGCTGCTATTCTGTTGGCCAAAGCTTTTGGTGATGCTGAGA
```

Figura 33.- Secuencia nucleotídica del fragmento del gen de prohibitina-1 de *L. decemlineata* amplificado por PCR.

Mediante el empleo del programa BLASTn 2.2.24 (Altschul *et al.*, 1997) se encontró que la secuencia de dicho fragmento se encuentra altamente conservada en los genes de prohibitina-1 de varios insectos, obteniéndose el menor valor esperado para el gen de *P. humanus corporis*, con cuya secuencia se obtuvo un 80% de identidad. Igualmente, se observó que la secuencia amplificada de *L. decemlineata* posee un 73% de identidad con su ortólogo en el coleóptero *T. castaneum*.

La traducción *in silico* de la secuencia del fragmento del gen de prohibitina-1 de *L. decemlineata* produjo un péptido de 118 aminoácidos cuya estructura primaria se muestra en la Figura 34. Utilizando el programa BLASTp 2.2.24 (Altschul *et al.*, 1997) comprobamos que dicha secuencia posee homología con prohibitina-1 de *T. castaneum* (92 % de identidad), así como con prohibitina-1 de otros insectos. En la secuencia traducida se encontraron varios de los péptidos que habían sido identificados por espectrometría de masas en proteínas del epitelio intestinal de *L. decemlineata* a las que se unió la toxina Cry3Aa (Figura 29).

QTSFRIYITILGQDYEERVLPSITTEVLKAVVAQFDAGELITQRDLVSKVSDDLTERAGQFGVILDDISLTHLTFG
REFTQAVELKQVAQQEA EKARFLVEKAEQTKKANSL S

Figura 34.- Secuencia aminoacídica de un fragmento de prohibitina-1 de *L. decemlineata*. En rojo se representan péptidos que habían sido identificados por espectrometría de masas

Estos resultados confirman la presencia de un gen, identificado en *L. decemlineata* en este trabajo por primera vez, que codifica para la proteína prohibitina-1 que interactúa con la toxina Cry3Aa de *B. thuringiensis*.

2.3- Localización de las actividades cisteín y metaloproteasa que procesan Cry3Aa en los microdominios de membrana de células disociadas del epitelio intestinal

Con el propósito de localizar en los microdominios de la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata* las actividades cisteín y metaloproteasa para las que la toxina Cry3Aa es sustrato, ensayamos el procesamiento proteolítico de Cry3Aa catalizado por las fracciones soluble e insoluble de las MECs. Para ello, incubamos la toxina con dichas fracciones y analizamos el perfil peptídico generado. Según se observa en la Figura 35, ambas fracciones proteolizaron Cry3Aa. La fracción insoluble principalmente produjo la aparición de una banda de 46 kDa, aunque también se generaron fragmentos de 57, 52 y 42 kDa. La fracción soluble produjo un fragmento de 30 kDa, además de los originados por la fracción insoluble. Los perfiles peptídicos generados por ambas fracciones se compararon con el producido por las BBMVs íntegras.

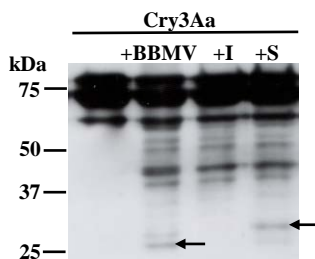


Figura 35- Perfil peptídico de la toxina Cry3Aa generado por las fracciones insoluble y soluble de las MECs. Immunodetección de la toxina Cry3Aa en los sobrenadantes obtenidos tras su incubación con las fracciones insoluble (I) y soluble (S) de las MECs o BBMV. Las flechas señalan fragmentos de toxina de 26 y 30 kDa generados diferencialmente por las BBMV y por la fracción soluble, respectivamente.

Previamente (apartado 1.3) habíamos descrito que la proteólisis de Cry3Aa catalizada por las BBMV resultaba inhibida por el inhibidor de metaloproteasas 1,10-fenantrolina. Para localizar la metaloproteasa que proteoliza Cry3Aa en los microdominios de membrana de las MECs, ensayamos la proteólisis de la toxina catalizada por las fracciones insoluble y soluble en presencia de dicho inhibidor. En la Figura 36 se observa que el compuesto 1,10-fenantrolina inhibió la formación del fragmento de 30 kDa que produce la fracción soluble, indicando que la metaloproteasa, posiblemente de la familia de las ADAM, que proteoliza Cry3Aa se localiza en la fracción soluble de las MECs (*non-rafts*).

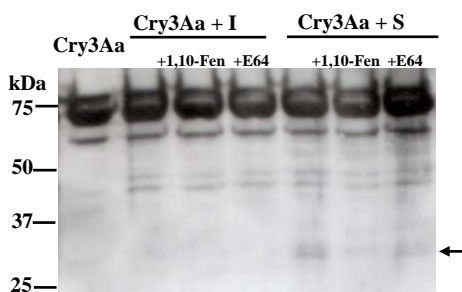


Figura 36.- Efecto de inhibidores de proteasas en la proteólisis de Cry3Aa catalizada por las fracciones insoluble y soluble de las MECs. Immunodetección de la toxina Cry3Aa en los sobrenadantes obtenidos tras la incubación de la toxina con las fracciones insoluble (I) y soluble (S) de las MECs en ausencia y en presencia del inhibidor de cisteín proteasas E64 (10 μ M, concentración final) y el inhibidor de metaloproteasas 1,10-fenantrolina (10 mM, concentración final). La flecha señala el fragmento de 30 kDa generado por la fracción soluble.

Igualmente se ensayó la proteólisis de la toxina catalizada por las fracciones soluble e insoluble de las MECs en presencia del inhibidor de cisteín proteasas E64. En el apartado 1.3 se describe que dicho compuesto inhibe la proteólisis de Cry3Aa catalizada por las BBMV. Según se observa en la Figura 36, en presencia de E64 no se produjo una variación apreciable en la intensidad de los fragmentos de proteólisis de Cry3Aa generados por las fracciones soluble e insoluble de las MECs, lo cual indica que en estas condiciones no se inhibió la actividad de las cisteín proteasas que proteolizan Cry3Aa.

Según se aprecia en la Figura 35, existen diferencias entre el perfil peptídico de Cry3Aa generado por las BBMV íntegras y el perfil generado por la fracción soluble. De manera reproducible, la principal diferencia entre ambos perfiles radica en las masas moleculares aparentes de los péptidos de bajo peso molecular. Las BBMV producen un fragmento de Cry3Aa de 26 kDa y el producido por la metaloproteasa de la fracción soluble es de 30 kDa. La diferencia en las masas moleculares de ambos péptidos podría indicar que aunque la metaloproteasa que origina el fragmento de Cry3Aa de 30 kDa se localiza en la fracción soluble, la interacción de la toxina con algún componente de la fracción insoluble (*rafts*) sería determinante en el resultado final de la proteólisis.

Estos resultados, junto a los obtenidos en el apartado 1.4.4.3 (Figura 22B) que describen la disminución de la proteólisis de la toxina Cry3Aa catalizada por las BBMV en presencia del compuesto extractor de colesterol MCD, indican que la interacción de la toxina Cry3Aa con las regiones de la membrana ricas en colesterol (*lipid rafts*) es necesaria para la proteólisis de la toxina.

3- Significado funcional de la interacción de Cry3Aa con la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata*

En los dos apartados anteriores (1 y 2) nos hemos centrado en el estudio de la interacción de la toxina Cry3Aa con la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata*, identificando y caracterizando proteínas no descritas con anterioridad capaces de interactuar con Cry3Aa, entre las que se encuentran las

prohibitinas, calmodulina, actina y demostrando que esta toxina puede ser sustrato de una metaloproteasa de membrana de la familia de las ADAM o de cisteín proteasas, principalmente digestivas, como las intestinaínas.

El modo de acción de las toxinas Cry de Bt es complejo y comprende una serie de eventos que pueden estar condicionados por el resultado de etapas previas, por lo que para tener un panorama más completo de la interacción de la toxina Cry3Aa con la membrana del epitelio intestinal del escarabajo de la patata decidimos abordar el estudio de etapas que tienen lugar antes y después de la interacción con la membrana, en relación con el resultado final de dicha interacción, la toxicidad en *L. decemlineata*.

3.1- Interacción de la toxina Cry3Aa quimotripsinizada con las BBMV de *L. decemlineata*

En relación a los eventos que tienen lugar previamente a la interacción con la membrana del epitelio intestinal, se ha sugerido que en el intestino de *L. decemlineata* podría existir una proteasa soluble con actividad proteolítica de tipo quimotripsina o similar que procesase la toxina Cry3Aa, facilitando su solubilización en el lumen del intestino y su unión a la membrana del epitelio intestinal (Martínez-Ramírez y Real, 1996; Carroll *et al.*, 1997).

Para estudiar la influencia del procesado proteolítico previo de la toxina Cry3Aa por la proteasa digestiva soluble quimotripsina, en la proteólisis de la toxina catalizada por la metaloproteasa ADAM, analizamos el perfil peptídico generado por las BBMV de la toxina Cry3Aa quimotripsinizada. Adicionalmente, comparamos dicho perfil peptídico con el producido por las BBMV en la toxina tripsinizada, puesto que se ha descrito, que al contrario de la quimotripsinización, la tripsinización de la toxina Cry3Aa no favorece su solubilización ni su unión a la membrana (Martínez-Ramírez y Real, 1996; Carroll *et al.*, 1997).

La quimotripsinización de Cry3Aa produjo la aparición de un fragmento de 49 kDa, además de un segundo fragmento de 44 kDa, mientras que el tratamiento con tripsina produjo tres fragmentos de 44, 33 y 25 kDa (Figura 37). La mezcla

resultante del procesado proteolítico de la toxina con cada serín proteasa se incubó, de manera independiente, con BBMV. En el caso de la toxina previamente quimotripsinizada, la incubación con las BBMV produjo la aparición de nuevos fragmentos de proteólisis, principalmente de 33 y 25 kDa, y también de 37, 22 y 20 kDa (Figura 37). La incubación con BBMV de la toxina previamente tratada con tripsina no produjo cambio alguno en el perfil peptídico (Figura 37).

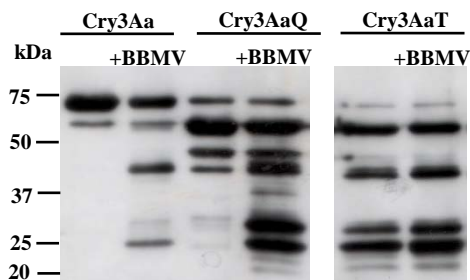


Figura 37.- Perfil peptídico de la toxina Cry3Aa quimotripsinizada o tripsinizada generado por las BBMV de *L. decemlineata*. Inmunodetección de la toxina Cry3Aa nativa, quimotripsinizada (Cry3AaQ) o tripsinizada (Cry3AaT) en los sobrenadantes obtenidos tras la incubación con BBMV.

Se ensayó la proteólisis de Cry3Aa quimotripsinizada por BBMV en presencia del inhibidor de metaloproteasas 1,10-fenantrolina. Según se observa en la Figura 38, el tratamiento con 1,10-fenantrolina produjo la inhibición del procesado proteolítico catalizado por las BBMV, indicando que al igual que la toxina sin procesar, la toxina quimotripsinizada puede ser sustrato de la metaloproteasa ADAM asociada a las BBMV.

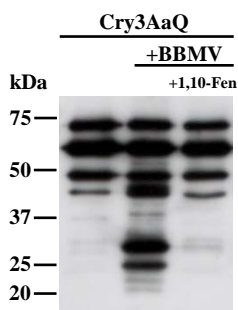


Figura 38.- Efecto del inhibidor de metaloproteasas 1,10-fenantrolina en la proteólisis de la toxina Cry3Aa quimotripsinizada por las BBMV. Inmunodetección de la toxina Cry3Aa quimotripsinizada en el sobrenadante obtenido tras su incubación con las BBMV en ausencia y en presencia de 1,10-fenantrolina (10 mM, concentración final).

En conjunto, estos resultados indican que el procesado proteolítico de la toxina Cry3Aa por una proteasa soluble de tipo quimotripsina es compatible con la proteólisis posterior de la toxina catalizada por una o varias metaloproteasas, probablemente de la familia de las ADAM, como resultado de su interacción con la membrana del epitelio intestinal.

3.2- Formación de poro de Cry3Aa en BBMV de *L. decemlineata*

La formación de poros es uno de los eventos que se ha propuesto que tienen lugar tras la interacción de las toxinas Cry de Bt con la membrana del epitelio intestinal del insecto diana. Con anterioridad a este trabajo, nuestro grupo había descrito que la interacción de la toxina Cry3Aa con las BBMV de *L. decemlineata* aumenta la formación de poro *in vitro* de la toxina, en comparación con aquella que no había estado en contacto con las vesículas (Rausell *et al.*, 2004). En este trabajo hemos comprobado que Cry3Aa es sustrato de cisteín y metaloproteasas asociadas a las BBMV y que como resultado de la interacción con éstas se produce la aparición de fragmentos de toxina de bajo peso molecular.

Para estudiar la influencia del procesado proteolítico de Cry3Aa catalizado por las BBMV en la actividad formadora de poro de la toxina *in vitro*, analizamos la formación de poro de toxina que había sido previamente incubada con BBMV en ausencia y presencia del péptido pep-99 (competidor por los sitios de corte de las proteasas capaces de proteolizar Cry3Aa), así como también de los inhibidores de metaloproteasas 1,10-fenantrolina y ácido acetohidroxámico y del péptido pep-rec (competidor por el sitio de reconocimiento de la toxina Cry3Aa por la metaloproteasa ADAM). Para ello, los sobrenadantes correspondientes a dichas incubaciones se añadieron a BBMV que contenían calceína encapsulada y se monitorizó el aumento en la intensidad de la fluorescencia producido por la liberación del fluoróforo.

Según se observa en la Figura 39, los sobrenadantes procedentes de las incubaciones que contenían el péptido pep-99 o el inhibidor de metaloproteasas ácido acetohidroxámico produjeron un marcado aumento en la actividad formadora

de poros de Cry3Aa. El sobrenadante proveniente de la incubación en presencia de 1,10-fenantrolina no pudo ser analizado porque interfería en la emisión de la fluorescencia de la calceína.

Previamente habíamos descrito que el procesado proteolítico de Cry3Aa catalizado por las BBMV resulta inhibido en presencia del péptido pep-99 (apartado 1.2) y del inhibidor de metaloproteasas ácido acetohidroxámico (apartado 1.3). Los resultados de inhibición de la proteólisis de Cry3Aa y los de formación de poro de la toxina *in vitro* en presencia de dichos compuestos indican que la inhibición de la proteólisis de la toxina Cry3Aa catalizada por las proteasas asociadas a la membrana del epitelio intestinal produce un aumento en la capacidad formadora de poros de la toxina *in vitro*, probablemente porque se evita la degradación de toxina.

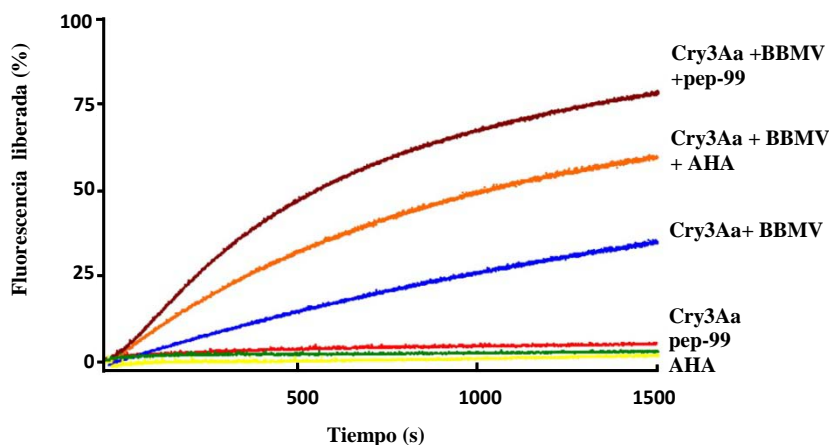


Figura 39.-Liberación de calceína encapsulada en BBMV por la toxina Cry3Aa en presencia de inhibidores de la proteólisis. Liberación de calceína en función del tiempo por acción la toxina Cry3Aa (44 nM) en ausencia y en presencia del péptido competidor por el sitio de corte pep-99 (150 μ M) y el inhibidor de metaloproteasas ácido acetohidroxámico (AHA) (2 μ M). Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado, se muestran trazos representativos de una réplica de cada uno. El péptido pep-99, el ácido acetohidroxámico y la toxina Cry3Aa se añadieron independientemente a BBMV que contenían calceína encapsulada, como control. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 490 y 520 nm, respectivamente. La máxima intensidad de la fluorescencia corresponde al 100% de liberación de calceína obtenida tras la adición de Tritón X-100.

La presencia del péptido pep-rec, competidor por el sitio de reconocimiento en la toxina Cry3Aa por la metaloproteasa ADAM, produjo una drástica disminución en la formación de poro de la toxina *in vitro* (Figura 40), indicando que la interacción de Cry3Aa con la metaloproteasa ADAM asociada a la membrana del epitelio intestinal es un evento clave para la formación de poro *in vitro*.

Previamente habíamos comprobado que en presencia del péptido pep-rec se inhibe la proteólisis de la toxina Cry3Aa catalizada por las BBMV (apartado 1.4.4.2). Este resultado, junto a la disminución de la actividad formadora de poro de Cry3Aa *in vitro* en presencia del péptido pep-rec evidencia que la interacción de Cry3Aa con la metaloproteasa ADAM es clave para la formación de poro, aunque producto de dicha interacción tenga lugar la proteólisis de la toxina. Si la proteólisis de Cry3Aa por la metaloproteasa ADAM se evita, la formación de poros es mayor, tal y como hemos comprobado que sucede en presencia del péptido pep-99 ó del inhibidor de metaloproteasas ácido acetohidroxámico (Figura 39), pero es necesario que la toxina Cry3Aa interactúe con la metaloproteasa ADAM para formar poros.

Estos resultados sugieren que la interacción de la toxina Cry3Aa con la metaloproteasa ADAM podría producir un cambio en la conformación de la toxina Cry3Aa que aumente su capacidad para formar poros *in vitro*. Pero, dado que la toxina puede ser sustrato de la metaloproteasa, como resultado de esta interacción la toxina también se proteoliza, lo cual produce una disminución en su capacidad para formar poros. El resultado final de la actividad formadora de poros de Cry3Aa *in vitro* estaría determinado por la competencia entre ambos eventos.

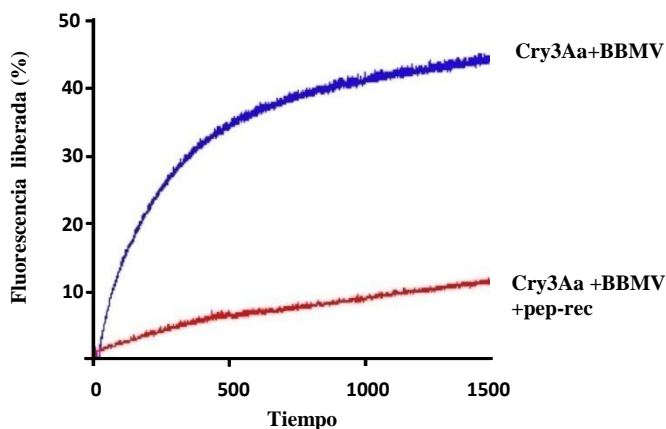


Figura 40.- Liberación de calceína encapsulada en BBMV por la toxina Cry3Aa. Liberación de calceína en función del tiempo por acción de la toxina Cry3Aa (44 nM) en ausencia y en presencia del péptido competidor por el sitio de reconocimiento pep-rec (2 nM). Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado, se muestran trazos representativos de una réplica de cada uno. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 490 y 520 nm, respectivamente. La máxima intensidad de la fluorescencia corresponde al 100% de liberación de calceína obtenida tras la adición de Tritón X-100.

Paralelamente analizamos el efecto de la interacción de la toxina Cry3Aa procesada con quimotripsina con las BBMV en su capacidad formadora de poro *in vitro*, en comparación con la formación de poros de la toxina quimotripsinizada que no había estado en contacto con las vesículas, o de la toxina sin procesar incubada y sin incubar con BBMV. Para ello, la toxina quimotripsinizada se incubó con las BBMV, el sobrenadante correspondiente se añadió a BBMV que contenían calceína encapsulada y se monitorizó el aumento en la intensidad de la fluorescencia producido por la liberación del fluoróforo. La figura 41 muestra que, de manera análoga a lo descrito para la toxina sin procesar (Rausell *et al.*, 2004), la interacción de Cry3Aa quimotripsinizada con las BBMV produjo un aumento en su actividad formadora de poros *in vitro*, en comparación con la toxina quimotripsinizada que no había estado en contacto con las vesículas. Además, se aprecia que la liberación de calceína producida por la toxina quimotripsinizada e incubada con BBMV fue mayor que la de la toxina sin procesar también incubada con BBMV. Estos resultados evidencian que el procesado quimotriptico de Cry3Aa

favorece el efecto provocado por la interacción con las BBMV que produce el aumento en la capacidad formadora de poros de la toxina *in vitro*.

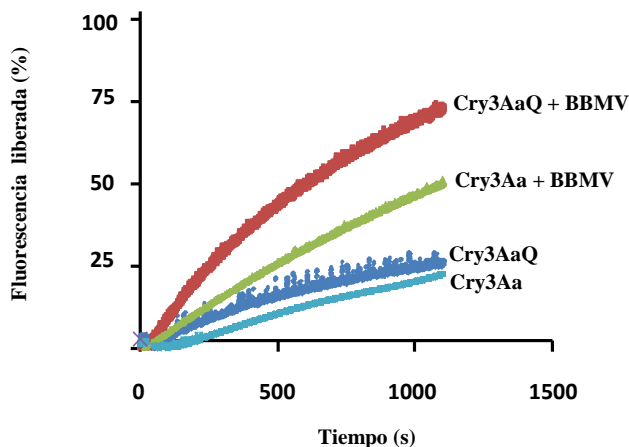


Figura 41.- Liberación de calceína encapsulada en BBMV por la toxina Cry3Aa quimotripsinizada. Liberación de calceína en función del tiempo por acción de Cry3Aa intacta y quimotripsinizada incubadas y sin incubar con BBMV. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado, se muestran trazos representativos de una réplica de cada uno. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 490 y 520 nm, respectivamente. La máxima intensidad de la fluorescencia corresponde al 100% de liberación de calceína obtenida tras la adición de Tritón X-100.

3.3- Toxicidad de Cry3Aa en *L. decemlineata*

El resultado final de la interacción de las toxinas Cry de Bt con la membrana del epitelio intestinal es la generación de toxicidad en el insecto diana. Dado que en el presente trabajo hemos comprobado que la interacción de Cry3Aa con la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata* origina la proteólisis de la toxina, nos propusimos estudiar la influencia de dicho procesado proteolítico en la toxicidad generada por Cry3Aa en células dissociadas del epitelio intestinal y en larvas del escarabajo de la patata.

3.3.1- Toxicidad de Cry3Aa en células disociadas del epitelio intestinal de *L. decemlineata*

Se examinó la toxicidad de Cry3Aa en células disociadas del epitelio intestinal (MECs) de *L. decemlineata* en presencia de compuestos cuyo efecto en la proteólisis de Cry3Aa por las BBMV habíamos ensayado previamente. La viabilidad de las células se estimó por exclusión de azul de tripán. En todas las ocasiones trabajamos con preparaciones que contenían entre un 75 y un 90% de células viables.

Para analizar el efecto del aumento de la proteólisis de Cry3Aa en su citotoxicidad se empleó el compuesto TFP, inhibidor de calmodulina y estimulador de la actividad proteolítica de metaloproteasas ADAM. En el apartado 1.4.4.2 habíamos comprobado que dicho compuesto aumenta la proteólisis de Cry3Aa catalizada por las BBMV (Figura 21A). Con este fin, las MECs fueron incubadas con TFP y seguidamente tratadas con una dosis subletal de toxina. En la Tabla 6 se muestra que el tratamiento con TFP provocó un gran aumento en la toxicidad producida por Cry3Aa, alcanzándose un 35,2% de mortalidad, lo cual indica que el procesado proteolítico de la toxina Cry3Aa por la metaloproteasa ADAM asociada a la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata* aumenta la toxicidad de Cry3Aa en el insecto.

Tratamiento	Muerte Celular (%)	Mortalidad neta (%)
Cry3Aa (2,3 μ M)	7,0 \pm 0,6	0
Na ₂ CO ₃ (50 mM)	7,8 \pm 0,4	
TFP (100 μ M) + Cry3Aa (2,3 μ M)	44,1 \pm 6,9	35,2 \pm 7,3
TFP + Na ₂ CO ₃	8,9 \pm 0,4	

Tabla 6.- Mortalidad de la toxina Cry3Aa en MECs de *L. decemlineata*. Se indican los porcentajes de mortalidad de Cry3Aa en ausencia y en presencia de TFP, del compuesto TFP y del tampón empleado. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Asimismo, se ensayó la citotoxicidad de Cry3Aa en presencia del compuesto extractor de colesterol MCD, el cual habíamos comprobado que disminuye el procesado proteolítico de Cry3Aa catalizado por las BBMV (Figura 21B). Para ello, las MECs se incubaron con MCD y a continuación se expusieron a una dosis de toxina que produce alrededor de un 20% de mortalidad. Tal y como se aprecia

en la Tabla 7, el tratamiento con MCD provocó una disminución en la mortalidad de las MECs del 1,9%. Este resultado, unido a la disminución originada por este compuesto en la proteólisis de Cry3Aa catalizada por las BBMV (Figura 22B), evidencia la necesidad de la interacción de Cry3Aa con las regiones de la membrana del epitelio intestinal enriquecidas en colesterol, así como del procesamiento proteolítico de la toxina por las proteasas asociadas a dicho epitelio para la toxicidad frente a *L. decemlineata*.

Tratamiento	Muerte Celular (%)	Mortalidad neta(%)
Cry3Aa (5,9 μ M)	22,8 \pm 0,6	8,2 \pm 0,9
Na ₂ CO ₃ (50 mM)	14,6 \pm 0,3	
MCD (2,5 mM) + Cry3Aa (5,9 μ M)	19,1 \pm 0,4	4,3 \pm 0,6
MCD + Na ₂ CO ₃	14,8 \pm 0,2	

Tabla 7.- Mortalidad de la toxina Cry3Aa en MECs de *L. decemlineata*. Se muestran los porcentajes de mortalidad de Cry3Aa en ausencia y en presencia de MCD, así como del compuesto MCD y del tampón utilizado. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Dado que en este trabajo hemos comprobado que la interacción de la toxina Cry3Aa con la metaloproteasa ADAM asociada al epitelio intestinal de *L. decemlineata* es clave para la formación de poro de la toxina (Figura 40), evento que ha sido implicado en el modo de acción de las toxinas Cry de Bt, y que el aumento de la proteólisis de Cry3Aa en presencia de un compuesto estimulador de la actividad proteolítica de metaloproteasas ADAM se traduce en un aumento de la toxicidad de Cry3Aa en MECs (Tabla 6), nos propusimos estudiar la relevancia de la interacción de la toxina Cry3Aa con la metaloproteasa ADAM en la toxicidad generada en *L. decemlineata*.

Para ello, analizamos la toxicidad en MECs de *L. decemlineata* producida por el péptido pep-rec, que representa la secuencia a través de la cual la toxina Cry3Aa es reconocida por la metaloproteasa ADAM. Como control, analizamos la toxicidad originada por el péptido pep-rec barajado (Ac-RFNYPFTGYHDQFGNS-NH₂), cuya estructura contiene los mismos aminoácidos que posee el péptido pep-rec dispuestos al azar, y por el péptido pep-99, que representa una de las regiones del dominio III de Cry3Aa por la que la toxina es proteolizada por las proteasas asociadas al epitelio intestinal de *L. decemlineata*.

Al igual que en los ensayos de citotoxicidad de Cry3Aa en MECs, la viabilidad de las células se estimó por exclusión de azul de tripán y trabajamos con preparaciones que contenían entre un 75 y 90% de células viables.

Según se aprecia en la Tabla 8, el péptido pep-rec produjo un 8,5% de mortalidad en las MECs, indicando que la interacción de la toxina Cry3Aa a través de la región representada por este péptido, con la metaloproteasa ADAM asociada al epitelio intestinal de *L. decemlineata* es capaz de generar citotoxicidad. La incubación de las MECs con los péptidos pep-rec barajado y pep-99, a la misma concentración a la que se empleó el péptido pep-rec, no produjo efecto citotóxico alguno (Tabla 8), evidenciando que la citotoxicidad generada por el péptido pep-rec en las MECs de *L. decemlineata* es específica a la secuencia de la toxina Cry3Aa que representa dicho péptido.

Tratamiento	Muerte Celular (%)	Mortalidad neta(%)
Péptido pep-rec (1,6 mM)	34,7 ± 0,2	8,5 ± 1,4
DMSO: PBS(1:10, v/v)	26,2 ± 1,2	
Péptido pep-rec barajado (1,6 mM)	22,6 ± 0,5	0,0 ± 0,7
PBS	22,6 ± 0,2	
Péptido pep-99 (1,6 mM)	22,0 ± 0,3	0,2 ± 0,4
PBS	21,8 ± 0,1	

Tabla 8.- Mortalidad de los péptidos pep-rec, pep-rec barajado y pep-99 en MECs de *L. decemlineata*. Se muestran los porcentajes de mortalidad de cada péptido, así como los de las soluciones o el tampón empleados para disolverlos. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Los resultados presentados en el presente apartado se obtuvieron en colaboración con el Lic. Jorge Sánchez (IBT-UNAM).

3.3.2- Toxicidad en larvas de *L. decemlineata*

Se analizó la toxicidad de Cry3Aa en larvas de *L. decemlineata* en presencia del péptido pep-99, competidor por los sitios de corte de las proteasas que proteolizan Cry3Aa, del inhibidor de metaloproteasas ácido acetohidroxámico, y del compuesto extractor de colesterol MCD. La toxicidad producida por cada una de estas mezclas fue comparada con la generada por Cry3Aa. No fue posible ensayar

la toxicidad de Cry3Aa en presencia de TFP o el péptido pep-rec, porque dichos compuestos deben disolverse en DMSO y comprobamos que el DMSO disminuye la toxicidad de Cry3Aa.

En la Tabla 9 se indican los valores de mortalidad de las larvas para cada tratamiento. Según se observa en dicha tabla, la presencia de todos los compuestos ensayados provocó la disminución en la toxicidad de Cry3Aa, indicando que tanto el procesado proteolítico de Cry3Aa por las proteasas asociadas a la membrana del epitelio intestinal como la interacción de la toxina con las regiones de la membrana ricas en colesterol son eventos claves para la toxicidad en *L. decemlineata*.

Tratamiento	Mortalidad de larvas (%)
Cry3Aa (1,2 μM) (Na₂CO₃)	65,2 \pm 1,2
Na ₂ CO ₃ (50 mM)	0
Cry3Aa + Pep-99 (9,4 mM) (PBS)	12,9 \pm 3,9
Pep-99 + Na ₂ CO ₃	0
Cry3Aa + AHA (11,5 mM) (H₂O)	41,7 \pm 3,2
AHA + Na ₂ CO ₃	0
Cry3Aa + MCD (20 mM) (H₂O)	26,1 \pm 4,0
MCD + Na ₂ CO ₃	0

Tabla 9.- Mortalidad de la toxina Cry3Aa en larvas de cuarto estadio de *L. decemlineata*. Se incluyen los porcentajes de mortalidad de los tratamientos con Cry3Aa en ausencia y en presencia de los compuestos AHA, MCD y el péptido pep-99, así como los controles de toxicidad de cada compuesto o péptido y los tampones utilizados. Los ensayos se realizaron por triplicado.

En conjunto, los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad de Cry3Aa en larvas y en MECs de *L. decemlineata* indican que la proteólisis de la toxina Cry3Aa, al menos por la metaloproteasa ADAM asociada al epitelio intestinal de *L. decemlineata*, así como la interacción con regiones de la membrana enriquecidas en colesterol son eventos necesarios en la toxicidad de Cry3Aa contra el escarabajo de la patata.

Discusión

Discusión

La diana principal de las toxinas Cry de Bt son las células del epitelio intestinal, en las cuales las interacciones con proteínas que puedan estar implicadas en mecanismos de reconocimiento, activación, degradación o señalización, son eventos clave en la toxicidad generada en los insectos. Por ello, la identificación de las proteínas de *L. decemlineata* involucradas en estos procesos y el análisis de su participación en el modo de acción de la toxina Cry3Aa resulta de gran relevancia para el control del escarabajo de la patata, plaga devastadora que ha demostrado una elevada capacidad para desarrollar resistencia frente a un gran número de insecticidas, y pueden contribuir a lograr una mejor comprensión del modo de acción general de las toxinas Cry de Bt.

1-Proteólisis de la toxina Cry3Aa catalizada por las BBMV de *L. decemlineata*

Previamente, Rausell *et al.* (2004) describieron que la interacción de la toxina Cry3Aa con BBMV de *L. decemlineata* produce un marcado aumento en la capacidad formadora de poros de la toxina *in vitro*, en relación con la toxina que no había estado en contacto con las vesículas, sugiriendo que la interacción con la membrana produce una estructura de la toxina con mayor capacidad para insertarse en la membrana y formar poros. Dicho incremento en la formación de poros se correlacionó con la aparición de un oligómero de Cry3Aa (Rausell *et al.*, 2004). En el presente trabajo hemos comprobado además que la interacción de la toxina Cry3Aa con las vesículas de membrana produce la aparición de fragmentos de toxina de bajo peso molecular, que evidencian que Cry3Aa es sustrato de proteasas asociadas a BBMV.

De manera similar, Dai y Gill, (1993) describieron que la incubación de la toxina Cry11Aa con BBMV de *Culex quinquefasciatus* originaba un patrón de proteólisis específico, sugiriendo que el procesado de las toxinas Cry de Bt por proteasas asociadas a la membrana del epitelio intestinal del insecto diana podría tener alguna relevancia en el mecanismo de acción tóxica, tal y como sucede con la proteólisis catalizada por proteasas digestivas solubles. En el presente trabajo hemos observado que la incubación de la toxina con las BBMV de *L. decemlineata* produce la aparición de varios fragmentos de Cry3Aa con masas moleculares aparentes de alrededor de 47, 42, 38, 30, 26 y en ocasiones de 24 kDa (Figura 1). Previamente, Loseva *et al.* (2002) habían descrito que las BBMV de *L. decemlineata* únicamente generan un fragmento de Cry3Aa de 38 kDa resistente a la proteólisis. La diferencia entre el perfil proteolítico de Cry3Aa producido por las BBMV, obtenido por Loseva *et al.* (2002) y el observado por nosotros podría deberse a las diferencias que existen entre los protocolos de proteólisis utilizados, fundamentalmente en el tiempo de incubación. Hemos comprobado que el aumento del período de incubación de la toxina con las BBMV, de 10 min a 2 h produce una disminución en la intensidad de los fragmentos de proteólisis (Figura 2A) que indica que con el aumento del tiempo de incubación los propios fragmentos de proteólisis continúan siendo procesados. Dado que en el citado trabajo de Loseva *et al.* (2002) la incubación de la toxina con las BBMV se llevó a cabo durante 4, 6, 8 y 24 h, es probable que la detección de un único fragmento de proteólisis se deba que el resto de los fragmentos originados en las primeras etapas de la incubación se continúan proteolizando hasta obtenerse un único fragmento resistente a la proteólisis.

La separación por electroforesis bidimensional de los fragmentos de proteólisis de Cry3Aa (Figura 4) y la secuenciación de sus extremos N-terminal nos permitió establecer que el procesado catalizado por las proteasas asociadas a las BBMV tiene lugar al menos por el dominio III de la toxina, aunque no podemos descartar que la toxina también pueda proteolizarse por otras regiones. Las secuencias N-terminal SLDGA y DKV obtenidas para dos de los péptidos originados por la proteólisis se localizan en regiones expuestas del dominio III de Cry3Aa (Li *et al.*, 1991), que podrían ser accesibles a la interacción con proteasas asociadas a la membrana (Figura 5).

El péptido con secuencia N-terminal DKV contiene un bloque de 10 aminoácidos (DKVYIDKYEFIPVN) que se localizan en el extremo C-terminal de Cry3Aa, el cual se encuentra altamente conservado en otras toxinas Cry, incluyendo tres toxinas específicas para lepidópteros y dos activas contra dípteros (Carroll *et al.*, 1989; Chungjatupornchai *et al.*, 1988). Dicha región es esencial para la toxicidad en *Manduca sexta* (Schnepf y Whiteley, 1985) e igualmente podría serlo en la toxicidad generada por Cry3Aa en *L. decemlineata*.

El fragmento que contiene la secuencia N-terminal SLDGA se localiza en un segmento adyacente a la lámina β -18 de la región externa del dominio III. La especificidad del corte en dicha región la hemos comprobado mediante el péptido pep-99, que contiene en su estructura la secuencia SLDGA, el cual compitió la proteólisis de Cry3Aa catalizada por las BBMV (Figura 6). En esta región, la toxina Cry1Ac posee una inserción de 6 residuos que es única para esta proteína (Li *et al.*, 2001) y que resulta importante para la interacción con el receptor APN mediada por N-acetil galactosamina (Burton *et al.*, 1999).

Los resultados de la inhibición de la proteólisis de Cry3Aa en presencia de inhibidores de serín, cisteín y metaloproteasas (Figura 7), sugieren que el procesado proteolítico catalizado por las BBMV es un evento complejo en el que podrían estar implicadas varias clases de proteasas. Aunque en *L. decemlineata* las aspartil proteasas constituyen una de las proteasas mayoritarias en el intestino, cuya actividad es inhibida por el compuesto pepstatina A (Bolter y Jongsma, 1995, Michaud *et al.*, 1996, Novillo *et al.*, 1997), en nuestro trabajo la presencia de dicho compuesto no produjo una inhibición apreciable en el procesado proteolítico de Cry3Aa por las BBMV (Figura 8, carrera +P), lo cual indica que esta clase de proteasas no contribuyen significativamente en la proteólisis de la toxina.

El análisis del perfil peptídico de Cry3Aa generado por las proteasas de las BBMV de *L. decemlineata* en presencia de inhibidores de proteasas específicos mostró que la proteólisis de la toxina se inhibe por los inhibidores de cisteín y serín proteasas leupeptina y TPCK, por el inhibidor de cisteín proteasas E64 y por los inhibidores de metaloproteasas 1,10-fenantrolina y ácido acetohidroxámico (Figura 8). Estos resultados evidencian que Cry3Aa es sustrato de cisteín proteasas y metaloproteasas asociadas a las BBMV de *L. decemlineata*.

Las cisteín proteasas constituyen otra de las clases de proteasas digestivas mayoritarias en el intestino del escarabajo de la patata (Murdock *et al.*, 1987; Bolter y Jongsma, 1995). Varios grupos de investigadores han descrito en este insecto la inhibición de dichas proteasas por los inhibidores E64 y leupeptina (Michaud *et al.*, 1993; Bolter y Jongsma, 1995; Novillo *et al.*, 1997; Loseva *et al.*, 2002). Por ello, la inhibición de la proteólisis de Cry3Aa en presencia de estos compuestos (Figura 8) indica que las BBMV de *L. decemlineata* contienen cisteín proteasas que podrían estar implicadas en el procesado proteolítico de la toxina Cry3Aa.

El compuesto TPCK es un inhibidor específico de quimotripsina (Hahm *et al.*, 1995), aunque también puede inhibir otras serín proteasas y cisteín proteasas como papaína. Previamente, Martínez-Ramírez y Real (1996) y Carroll *et al.* (1997) propusieron que en el jugo intestinal de *L. decemlineata* podría existir una actividad de tipo quimotripsina, o similar, que procesase la toxina Cry3Aa. La inhibición de la proteólisis de Cry3Aa por las BBMV de *L. decemlineata* en presencia de TPCK (Figura 8) abre la posibilidad de que una actividad de tipo quimotripsina, que también podría localizarse en las BBMV de *L. decemlineata*, estuviera implicada en la proteólisis de la toxina Cry3Aa en el propio epitelio intestinal. Novillo *et al.* (1997) también describieron la presencia de una actividad de tipo quimotripsina en el intestino de *L. decemlineata*, no obstante, estos investigadores encontraron que dicha actividad resultó eficientemente inhibida por el inhibidor de serín proteasas PMSF, el cual no inhibe significativamente la proteólisis de Cry3Aa catalizada por las BBMV (Figura 8). Es necesario señalar que estos resultados no nos permiten descartar que la inhibición del procesado proteolítico de Cry3Aa en presencia de TPCK también pueda deberse a que se inhiban cisteín proteasas asociadas a las BBMV. En ese sentido, en el citado trabajo de Novillo *et al.* (1997) se describe la inhibición del corte proteolítico de sustratos específicos de cisteín proteasas catalizado por homogeneizados del intestino de larvas de *L. decemlineata* en presencia de TPCK.

Respecto a las metaloproteasas presentes en las BBMV de *L. decemlineata*, capaces de proteolizar Cry3Aa, no se ha estudiado previamente la proteólisis de esta toxina por ninguna metaloproteasa de *L. decemlineata*. Novillo *et al.* (1997)

describieron que homogeneizados del intestino de larvas de *L. decemlineata* proteolizaron sustratos específicos para las metaloproteasas dependientes de zinc carboxipeptidasa A (M14) y leucina-aminopeptidasa A (M17), y que la proteólisis de ambos sustratos se inhibió en presencia de 1,10-fenantrolina. La actividad leucina-aminopeptidasa A fundamentalmente se localizó en los tejidos de las paredes del intestino. Aunque estas metaloproteasas podrían proteolizar Cry3Aa, a lo largo de nuestro trabajo no hemos encontrado evidencias que apoyen esta posibilidad.

Las metaloproteasas presentan una gran variedad de estructuras. Atendiendo a la homología de secuencia se clasifican en diferentes familias, las cuales se designan con una letra M mayúscula y un número arábigo (Rawlings y Barrett, 1993). En la actualidad existen aproximadamente 80 familias diferentes de metaloproteasas (Rawlings *et al.*, 2010; base de datos MEROPS <http://merops.sanger.ac.uk>). La gran mayoría de estas proteasas dependen del zinc para su actividad, constituyendo la superfamilia de las zincinas, que según las estructuras de sus sitios catalíticos se subdividen en gluzincinas, aspzincinas y metzincinas (Hooper, 1994; Gomis-Rüth, 2003). El compuesto 1,10-fenantrolina es un inhibidor altamente selectivo para las metaloproteasas dependientes de Zn^{2+} (Salvesen y Nagase, 2001). En cambio, el ácido acetohidroxámico así como otros compuestos peptídicos basados en hidroxamatos son inhibidores específicos para metaloproteasas pertenecientes al clan de las metzincinas, como las MMPs (M10), las ADAM (M12B) o las astacinas (M12A) (Wagner *et al.*, 2002; revisado en Seals y Courtneidge, 2003). En este trabajo, la inhibición de la proteólisis de Cry3Aa en presencia de 1,10-fenantrolina y de ácido acetohidroxámico (Figura 8) evidencia que la toxina puede ser sustrato de metaloproteasas que dependen del zinc para su actividad catalítica, las cuales podrían pertenecer al clan de las metzincinas.

El procesado proteolítico de la toxina Cry3Aa por metaloproteasas asociadas a la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata* es un evento novedoso en el mecanismo de acción general de las toxinas Cry de Bt y dada la importancia biológica de muchas de las funciones de estas metaloproteasas, la proteólisis de la toxina Cry3Aa por esta clase de proteasas podría ser relevante en su modo de acción en el escarabajo de la patata.

Para la identificación de los posibles receptores de las toxinas Cry de Bt se ha utilizado ampliamente la técnica bioquímica de *Ligand blot* (revisado en Pigott y Ellar, 2007). En el presente trabajo, como aproximación inicial para identificar las proteasas asociadas a las BBMV que proteolizan Cry3Aa, llevamos a cabo un *Ligand blot* bidimensional (Figura 10D) que nos permitió detectar proteínas de BBMV a las que se unió la toxina. Los extremos N-terminal de dichas proteínas de unión se secuenciaron, obteniéndose únicamente la secuencia de una proteína de masa molecular aparente de 30 kDa, la cual resultó una señal compleja compuesta por varias posibles secuencias. Con las secuencias generadas y en el marco de la principal limitación con la que hemos contado durante la realización del presente trabajo, la casi total ausencia de secuencias genómicas de *L. decemlineata* en las bases de datos, llevamos a cabo búsquedas de proteasas con estructuras primarias homólogas en la base de datos NCBIInr.

Dado que como resultado del avance de las técnicas de secuenciación de genomas continuamente se están depositando en las bases de datos nuevas secuencias de proteínas, las búsquedas de proteasas con homología a las posibles secuencias N-terminal obtenidas se llevaron a cabo en repetidas ocasiones durante la realización de este trabajo. En el inicio del trabajo (enero de 2007), la secuencia N-terminal SPDFKL mostró homología (6/6 identidades) con el precursor de la metaloproteasa ADAM10 de *Xenopus laevis* (Tabla 1) y recientemente (mayo de 2010) con dicha secuencia además encontramos homología con el precursor de la metaloproteasa ADAM10 de *Xenopus (Sirulana) tropicalis*. La secuencia VPDSID resultó tener homología con metaloproteasas de la subfamilia M12A de *C. quinquefasciatus* y *Aedes aegypti* (6/6 identidades), similares a la astacina de *Astacus astacus*, así como con varias intestinaínas (6/6 identidades), cisteín proteasas digestivas de *L. decemlineata* (Tabla 1).

Las cisteín proteasas de *L. decemlineata* con las que presentó homología la secuencia N-terminal VPDSID de la proteína de las BBMV a la que se une Cry3Aa fueron las intestinaínas D-15, D-5, D-13, D-4, D-6, D-14, B-12, B-11 y B-4. Igualmente, con estas secuencias se encontró homología con proteínas del himenóptero *Camponotus floridanus* y de los coleópteros *Sphenophorus levis* y *Diabrotica virgifera virgifera* similares a la cisteín proteasa digestiva catepsina L.

Tanto las intestaínas como las catepsinas L pertenecen a la superfamilia de peptidasas C1 y a la familia C1A, a la cual también pertenecen otras cisteín proteasas digestivas como papaína y catepsinas B, L y H.

Las intestaínas son cisteín proteasas digestivas identificadas en *L. decemlineata* que actúan en el espacio extracelular, a diferencia de otras proteasas de la misma familia que son intracelulares. Se les denominó intestaínas por su similitud a la papaína y su localización en el intestino (Gruden *et al.*, 2003).

Estas proteínas se identificaron en los intestinos de larvas de *L. decemlineata* alimentadas con plantas de patata que contenían elevados niveles de inhibidores de cisteín proteasas (insectos adaptados). Inicialmente se aislaron tres miembros de esta familia a los que se denominó intestaínas 1, 2 y 3 (Gruden *et al.*, 2003). Dichas proteasas mostraron diferente especificidad de sustrato y perfiles de inhibición específicos, a partir de los cuales se sugirió que las intestaínas 1 y 2 podrían estar implicadas en la digestión de las proteínas ingeridas en la dieta, mientras que la intestaína 3 podría estar implicada en mecanismos de proteólisis más específicos. Las tres cisteín proteasas resultaron inhibidas por el compuesto E64, el cual hemos demostrado también inhibe la proteólisis de la toxina Cry3Aa catalizada por las BBMV de *L. decemlineata*.

En un segundo trabajo, Gruden *et al.* (2004), partiendo de las secuencias N-terminal de las enzimas purificadas (Gruden *et al.*, 2003), aislaron y clonaron los genes de varias cisteín proteasas digestivas de intestinos adaptados de larvas de *L. decemlineata*. Los clones obtenidos se clasificaron según la homología de sus secuencias en tres grupos denominados intestaínas A, B y C. La homología de las secuencias aminoacídicas traducidas dentro de cada grupo resultó ser mayor del 90% y entre miembros de diferentes grupos de entre 35 y 62%. Estas proteasas comparten entre un 35 y un 40% de homología con catepsinas S, L, K, H y J de mamíferos y con otras cisteín proteasas de artrópodos. Resultados preliminares basados en ensayos de *Southern blot* obtenidos por Gruden *et al.* (2004) muestran que las intestaínas constituyen una familia multigénica en el genoma de *L. decemlineata*.

Estos investigadores no lograron relacionar las intestaínas 1, 2 y 3 purificadas de los intestinos adaptados de *L. decemlineata* (Gruden *et al.*, 2003) con las secuencias codificadas por los genes aislados de los grupos A, B y C (Gruden *et al.*, 2004). No obstante, basándose en el análisis de las estructuras aminoacídicas deducidas de las intestaínas A, B y C, así como en las propiedades enzimáticas de las intestaínas purificadas 1, 2 y 3, Gruden *et al.* (2004) sugirieron que la intestaína A podría corresponder a la intestaína 3 y que las intestaínas B y C podrían corresponder a la intestaína 2. Gruden *et al.* (2004) proponen que las intestaínas del grupo A podrían estar implicadas en mecanismos de proteólisis más específicos que los relacionados con la digestión de las proteínas ingeridas en la dieta, función que ha sido propuesta para las intestaínas de los grupos B y C.

Además de los grupos de intestaínas A, B y C establecidos en el trabajo de Gruden *et al.* (2004), se ha descrito un cuarto grupo formado por las intestaínas D, cuyas secuencias han sido depositadas en la base de datos NCBI por el mismo equipo de investigadores.

La proteína de las BBMV de *L. decemlineata* con la secuencia N-terminal VPDSID, a la cual se une la toxina Cry3Aa, presenta homología con intestaínas de los grupos B y D. La posible correspondencia entre las intestaínas del grupo B con la intestaína 2, la cual posee una amplia especificidad de sustrato, acorde con la función digestiva de las mismas, podría tener un efecto meramente degradativo en el caso de que pudiesen proteolizar Cry3Aa. No obstante, no podemos descartar que la proteólisis de Cry3Aa sea catalizada por otros miembros de la familia de las intestaínas, ya que mediante el análisis por espectrometría de masas de proteínas de BBMV que interactuaron con Cry3Aa a través de una región del lazo 1 del dominio II representada por el péptido pep-rec, identificamos la proteína intestaína A-26 (Tabla 3).

La interacción de la toxina Cry3Aa con cisteín proteasas digestivas de *L. decemlineata* de la familia de las intestaínas la hemos confirmado mediante la utilización del agente de entrecruzamiento Sulfo-SBED (Pierce) el cual nos permitió estudiar las proteínas de las BBMV con las que interactúa la toxina Cry3Aa en condiciones nativas (Figura 11). El análisis por espectrometría de masas de dichas proteínas mostró nuevamente que Cry3Aa podría interaccionar con

intestaínas de los grupos D y B (Figura 12, Tabla 2) en las que están presentes los aminoácidos VPDSID (Figura 13), que corresponden a la secuencia N-terminal determinada para la proteína de las BBMV a la que se unió Cry3Aa. Asimismo, en un análisis por espectrometría de masas de proteínas de los *lipid rafts* de células disociadas del epitelio intestinal de *L. decemlineata*, se identificaron las intestaínas D-5 y B-11, en las bandas I-37.1 e I-37.2, respectivamente (Tabla 5), corroborándose de esta manera que la toxina Cry3Aa interactúa con cisteín proteasas digestivas asociadas a la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata*.

Resulta interesante destacar que aunque las intestaínas de *L. decemlineata* son cisteín proteasas digestivas solubles, en este trabajo hemos encontrado en las BBMV proteínas pertenecientes a dicha familia que interactúan con Cry3Aa, (apartados 1.4.1, 1.4.2 y 1.4.4.2). Se ha descrito que las enzimas proteolíticas de los insectos son sintetizadas y liberadas por las células posteriores del epitelio intestinal a partir de formas asociadas a la membrana secuestradas en vesículas, que a su vez se asocian con el citoesqueleto. De esta manera las peptidasas se secretan como un complejo de partículas al espacio ectoperitrófico, a partir del cual se mueven transversalmente hacia el lumen del intestino donde son degradadas las proteínas de la dieta (Birk y Applebaum, 1960; Eguchi e Iwamoto, 1982; Brovosky, 1986). En ese sentido, la presencia de cisteín proteasas digestivas solubles en las BBMV de *L. decemlineata* podría deberse a su asociación con membranas del epitelio intestinal previamente a la digestión, o a que durante la preparación de las BBMV permaneciesen retenidas en el espacio ectoperitrófico, como consecuencia de que quedasen restos de la membrana peritrófica.

Junto a la identificación de la interacción de la toxina Cry3Aa con cisteín proteasas digestivas de la familia de las intestaínas (Tablas 1, 2, 3 y 5) y a la observada inhibición de la proteólisis de Cry3Aa en presencia de inhibidores de cisteín proteasas (Figuras 7 y 8), comprobamos que las BBMV de *L. decemlineata* catalizan el corte de dos péptidos fluorescentes sustratos sintéticos de cisteín proteasas, que se ha descrito son proteolizados por las cisteín proteasas digestivas de *L. decemlineata* (Figura 14A, B y C) (Loseva *et al.*, 2002; Gruden *et al.*, 2003; Goulet *et al.*, 2008). La adición de la toxina Cry3Aa compitió la proteólisis de

ambos péptidos (Figura 14A, B y C), confirmándose que Cry3Aa es sustrato de cisteín proteasas digestivas asociadas a las BBMV de *L. decemlineata*.

Si bien la implicación de las intestaínas en la adaptación de *L. decemlineata* a los mecanismos de defensa de las plantas de patata ha sido considerablemente estudiada (Gruden *et al.*, 2003; Gruden *et al.*, 2004), su interacción con la toxina Cry3Aa de Bt no había sido descrita hasta la fecha. En el presente trabajo se aportan evidencias, por primera vez, que indican que la toxina Cry3Aa se une y es proteolizada por cisteín proteasas digestivas de la familia de las intestaínas. Aunque se requiere continuar investigando para conocer la relevancia de la proteólisis de Cry3Aa por estas cisteín proteasas en la toxicidad generada en el escarabajo de la patata, los diferentes niveles de especificidad de sustrato y perfiles de inhibición que poseen los miembros de esta familia, así como la posible diversidad de sus funciones y la capacidad para inducir su expresión frente a determinados estímulos (Gruden *et al.*, 2003; Gruden *et al.*, 2004) sugieren que dicho estudio podría ser complejo de abordar.

Tal y como se ha señalado anteriormente, las posibles secuencias N-terminal SPDFKL y VPDSID de la proteína de las BBMV a la que se une Cry3Aa, también poseen homología con la metaloproteasa ADAM10 de *X. laevis* y con metaloproteasas de *C. quinquefasciatus* y *A. aegypti* similares a las astacinas, respectivamente. Tanto las ADAM como las astacinas pertenecen a la familia de metaloproteasas M12, las ADAM a la subfamilia M12B y las astacinas a la subfamilia M12A. Desde el punto de vista de la estructura de sus sitios activos, ambas metaloproteasas pertenecen al clan de las metzincinas, el cual se subdivide en familias de proteínas como las astacinas, ADAMs/adamalisinas/reprolisinas, serralisinas o metaloproteasas de la matriz extracelular (Gomis-Rüth, 2009). Las metzincinas poseen en su dominio metaloproteasa la secuencia altamente conservada de unión a zinc HEXXHXXGXX(H/D) (Stöcker y Bode, 1995). En el presente trabajo hemos comprobado que la proteólisis de la toxina Cry3Aa catalizada por las BBMV de *L. decemlineata* se inhibe en presencia de los compuestos 1,10-fenantrolina, inhibidor de metaloproteasas dependientes de zinc y ácido acetohidroxámico, inhibidor específico de metaloproteasas del clan de las metzincinas. De acuerdo con estos resultados, cualquier miembro de la familia de

las ADAM, de las astacinas, o de ambas, podría ser la metaloproteasa implicada en el proteólisis de Cry3Aa. No obstante, mediante ensayos de proteólisis de péptidos sintéticos descritos como sustratos de las metaloproteasas astacina (Stöcker y Zwilling, 1995) (Figura 15) ó ADAM10 (Amour *et al.*, 2000) comprobamos que las BBMV sólo fueron capaces de catalizar la proteólisis del sustrato de la metaloproteasa ADAM10 (Figura 16), y que además, la toxina Cry3Aa compitió la proteólisis de dicho sustrato (Figura 16), evidenciándose que la metaloproteasa asociada al epitelio intestinal de *L. decemlineata* que proteoliza Cry3Aa pertenece a la familia de las ADAM.

Las metaloproteasas ADAM son proteínas integrales de membrana de tipo I que poseen una estructura modular compuesta por un prodominio, un dominio metaloproteasa, un dominio de tipo desintegrina, un dominio rico en cisteínas, un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF), un dominio transmembrana y una cola citoplasmática que en muchos miembros de la familia posee sitios de unión específicos para varias proteínas implicadas en la señalización celular (revisado en Seals y Courtneidge, 2003). Junto a las metaloproteasas del veneno de serpiente y las ADAMTS (metaloproteasas ADAM con un dominio trombospondina) forman la familia de las adamalinas (revisado en Gomis-Rüth, 2009). Las ADAM se encuentran ampliamente distribuidas en todo el reino animal, y también se han encontrado en protozoos, en hongos filamentosos y en levaduras (revisado en Reiss y Saftig, 2009).

Desde el punto de vista funcional, las ADAM constituyen la principal familia de proteasas implicadas en la liberación proteolítica de los dominios extracelulares (*shedding* de ectodominios) de diversas proteínas unidas a la membrana, tales como factores de crecimiento, citoquinas, moléculas de adhesión, receptores y otros sustratos entre los que se encuentran la proteína del prión (PrP), la proteína precursora amiloide y componentes de la matriz extracelular (revisado en Seals y Courtneidge, 2003 y en Reiss y Saftig, 2009). Las metaloproteasas ADAM han sido implicadas en procesos de migración celular, morfogénesis, reparación de tejidos y determinación del destino celular, así como en diversos eventos del desarrollo tales como la fertilización, el remodelado de la matriz extracelular y la

neurogénesis. Igualmente, están implicadas en patologías como cáncer, Alzheimer o artritis (revisado en Reiss y Saftig, 2009).

La metaloproteasa ADAM10 es una de las proteasas de la subfamilia de las ADAM para la que se han encontrado sustratos endógenos en diferentes organismos, entre los que se encuentran las caderinas-E y -N (Maretzky *et al.*, 2005; Reiss *et al.*, 2005), moléculas que pertenecen a la misma familia que las proteínas de tipo caderina que han sido identificadas como receptores de algunas toxinas Cry de Bt en insectos lepidópteros (revisado en Soberón *et al.*, 2009) y en el coleóptero *T. molitor* (Fabrick *et al.*, 2009). Se ha sugerido que en el mecanismo de acción tóxica de Cry3Aa en *L. decemlineata* también podría estar implicado un receptor tipo caderina (Park *et al.*, 2009), lo cual permite postular que la proteólisis de Cry3Aa por la metaloproteasa ADAM10 podría estar mediada por la interacción de la toxina con el receptor tipo caderina que podría ser un sustrato endógeno de la metaloproteasa ADAM10 asociada al epitelio intestinal de *L. decemlineata*. En relación a la implicación de un receptor tipo caderina en el mecanismo de acción tóxica de Cry3Aa en el escarabajo de la patata, es necesario señalar que durante la realización del presente trabajo hemos llevado a cabo diferentes estrategias para aislar e identificar proteínas del epitelio intestinal de este insecto con las que interactúa la toxina Cry3Aa (apartados 1.4.2, 1.4.4.2, 1.4.4.3, 2.2) y en ninguna de estas aproximaciones experimentales hemos encontrado proteína alguna con homología con los receptores tipo caderina identificados en lepidópteros y en el coleóptero *T. molitor* (revisado en Soberón *et al.*, 2009; Fabrick *et al.*, 2009). La razón de ello podría radicar en la ausencia de secuencias proteicas de caderinas de *L. decemlineata* en las bases de datos, de manera que si en este insecto la secuencia del receptor para la toxina Cry3Aa tipo caderina estuviese poco conservada en relación a las secuencias de otras caderinas su identificación por homología sería dificultosa. Por tanto, no podemos descartar que en *L. decemlineata* este tipo de proteínas con homología a caderina esté implicado en el modo de acción de la toxina Cry3Aa.

ADAM10 posee homología con otros miembros de la familia, como ADAM17 o TACE, y sobre todo con Kuzbanian, su homólogo en *Drosophila melanogaster*. En *Drosophila*, Kuzbanian está implicada en el desarrollo neuronal temprano a través

de su participación en la ruta de señalización mediada por las proteínas Notch y Delta (Pan y Rubin, 1997). Igualmente, se ha sugerido que en *X. laevis* la metaloproteasa ADAM10 también podría estar implicada en la neurogénesis temprana (Pan y Rubin, 1997).

La similitud en la función de Kuzbanian en *D. melanogaster* con la metaloproteasa ADAM10 de *X. laevis*, con la que presenta homología la secuencia SPDFKL de una proteína de las BBMV de *L. decemlineata* a la que se unió Cry3Aa, nos permite proponer que en *L. decemlineata* podría existir un homólogo de ADAM10 con una función similar, que también podría localizarse en el epitelio intestinal y proteolizar la toxina Cry3Aa de Bt. Recientemente se han depositado en la base de datos NCBI las secuencias de un gran número de metaloproteasas homólogas a Kuzbanian de mosquitos, de varias especies del género *Drosophila* y del coleóptero *T. castaneum*, evidenciándose una amplia distribución de estas proteasas en insectos y reforzándose la posibilidad de su presencia en *L. decemlineata*.

La existencia de especificidad para la actividad proteolítica de las ADAM es un tema controvertido. Se ha comprobado que un único miembro de esta familia puede procesar varios sustratos y que un único sustrato puede ser proteolizado por varias de estas metaloproteasas (revisado en Seals y Courtneidge, 2003). Existen evidencias experimentales que señalan la presencia de determinados residuos específicos flanqueando el sitio de corte en algunos sustratos, lo cual sugiere la existencia de cierta selectividad intrínseca. Por el contrario, la variabilidad de las secuencias de los sitios de corte en otros sustratos y su tolerancia a mutaciones indican que también puede existir alguna flexibilidad de reconocimiento en los sitios activos (revisado en Huovila *et al.*, 2005). Se ha sugerido que la estructura secundaria de la región yuxtamembrana de los sustratos es un elemento de reconocimiento importante para estas metaloproteasas (revisado en Seals y Courtneidge, 2003).

Mediante la aplicación del programa MEME (Grundy *et al.*, 1996), Hattori *et al.* (2000) encontraron un motivo conservado fuera del sitio de corte en 11 proteínas sustrato de ADAM10 entre las que se encontraba la proteína efrina-A2, que se ha demostrado forma un complejo estable con la metaloproteasa ADAM10 en el que

están involucradas interacciones entre regiones que se encuentran fuera del dominio metaloproteasa y del sitio de corte del sustrato. La presencia de dicho motivo de reconocimiento sugirió la existencia de cierta especificidad de sustrato en ADAM10. La aplicación del programa MEME a Cry3Aa evidenció que la toxina contiene la secuencia consenso de reconocimiento en la región comprendida entre los aminoácidos 350 y 357 de su estructura primaria (Figuras 17 y 18A). A partir de dicha secuencia se sintetizó el péptido pep-rec, el cual compitió la proteólisis de la toxina catalizada por las BBMV (Figura 18B). Este resultado apoya la existencia de una metaloproteasa homóloga a ADAM10 asociada a las BBMV de *L. decemlineata*, capaz de reconocer la toxina Cry3Aa por la región representada por dicho péptido, por la que también son reconocidos otros sustratos de esta metaloproteasa.

Mediante la inmovilización del péptido pep-rec en una matriz sólida y su incubación con sobrenadante de BBMV comprobamos que la fracción eluida de dicha mezcla proteoliza un péptido fluorescente sustrato de ADAM10 (Figura 20), evidenciando la presencia de la metaloproteasa ADAM asociada a las BBMV que proteoliza Cry3Aa en esta fracción y confirmando la especificidad de su interacción con la toxina a través de la región representada por el péptido pep-rec.

Es importante destacar que parte de la secuencia consenso de reconocimiento se localiza en una región del lazo 1 del dominio II de Cry3Aa (R₃₄₅FQPGYYGND₃₅₄) en la que previamente Wu y Dean, (1996) y Wu *et al.* (2000) habían llevado a cabo sustituciones de los aminoácidos R₃₄₅, Y₃₅₀, Y₃₅₁, N₃₅₃ y D₃₅₄ que afectaron la afinidad de la unión y la toxicidad de Cry3Aa en *L. decemlineata*. Las evidencias experimentales aportadas por estos investigadores apoyan, que tal y como proponemos, la interacción de la toxina Cry3Aa con la metaloproteasa ADAM10, a través de la región representada por el péptido pep-rec, es relevante en la unión de la toxina al epitelio intestinal de *L. decemlineata* y en la toxicidad generada en este insecto. En ese sentido, en el presente trabajo hemos comprobado que la incubación del péptido pep-rec con células disociadas del epitelio intestinal (MECs) de *L. decemlineata* produce un efecto tóxico específico en dichas células (Tabla 8), que evidencia que la interacción de la toxina Cry3Aa con la metaloproteasa ADAM *per se* produce citotoxicidad. Adicionalmente,

comprobamos que el péptido pep-rec marcado con el fluoróforo fluoresceína se une a la superficie apical de células columnares que habían sido disociadas del epitelio intestinal de *L. decemlineata* (Figura 19). Dado que se ha propuesto que la membrana apical de las células columnares constituye la diana principal de las toxinas Cry de Bt y que en larvas de lepidópteros en ella se localiza el receptor tipo caderina (revisado en Pigott y Ellar, 2007), la unión del péptido pep-rec a esta región de las células columnares de *L. decemlineata* evidencia la implicación de la interacción de la toxina Cry3Aa con la metaloproteasa ADAM en la toxicidad generada en el escarabajo de la patata.

Un aspecto de interés en relación a las metaloproteasas ADAM es que el corte catalizado por proteasas de esta familia que produce la liberación de los fragmentos solubles de varias proteínas de membrana (*shedding*) puede tener lugar de manera constitutiva y también de forma inducible, en respuesta a diversos estímulos naturales o experimentales (revisado en Reiss y Saftig, 2009). Se ha descrito que la calmodulina puede estar implicada en la regulación de dicho proceso (*shedding*) mediante su interacción con la propia metaloproteasa, tal y como sucede en el caso del corte de la proteína CD44 por ADAM10 (Nagano *et al.*, 2004) o bien por su unión a las proteínas de membrana sustrato, como TrkA (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2000; Llovera *et al.*, 2004), L-selectina (Kahn *et al.*, 1998; Díaz-Rodríguez *et al.*, 2000), la proteína precursora β -amiloide (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2000), L1 (Kalus *et al.*, 2003), NCAM (Kalus *et al.* 2006) y ACE2 (Lambert *et al.*, 2008). En todos los casos la unión de calmodulina a la metaloproteasa o a la proteína sustrato produce la inhibición del corte proteolítico.

No se ha descrito la presencia de calmodulina en BBMV de *L. decemlineata*, aunque sí en otros insectos, como en *A. aegypti*, (Popova-Butler y Dean, 2009). En *L. decemlineata*, la inhibición de la proteólisis de Cry3Aa observada en presencia de calmodulina (Figura 23), junto con el aumento de la proteólisis de la toxina producida por el inhibidor de calmodulina TFP (Figura 22A), indican que la calmodulina está implicada en la regulación de la proteólisis de Cry3Aa por la metaloproteasa ADAM asociada a las BBMV de *L. decemlineata*.

El análisis por SDS-PAGE de la mezcla resultante de la incubación de Cry3Aa con calmodulina inmovilizada en una matriz evidenció que la toxina se une a esta proteína de manera específica (Figura 24), y que la participación de la calmodulina en la regulación del procesado proteolítico de Cry3Aa catalizado por la metaloproteasa ADAM podría estar relacionada con su interacción directa con la toxina, de manera independiente a la presencia de iones Ca^{+2} . Mediante el análisis de la estructura primaria de Cry3Aa utilizando un programa que predice la existencia de sitios de unión a calmodulina (Camodulin Target Database, <http://calcium.uhnres.utoronto.ca> [Yap *et al.*, 2000]) comprobamos que la toxina Cry3Aa contiene un posible sitio de unión a calmodulina en la secuencia comprendida entre los aminoácidos 253 y 271 localizados entre el final y el principio de las hélices α -7 y α -8 del dominio I (Figura 25). Resulta interesante destacar que parte de la secuencia de unión a calmodulina se localiza en la hélice α -7, que ha sido descrita como una de las hélices α del dominio I que posee una longitud suficiente para atravesar la bicapa lipídica (Li *et al.*, 2001), lo cual podría sugerir que la interacción de Cry3Aa con calmodulina se produce como consecuencia de la inserción de la toxina en la membrana en el proceso de formación de poro.

En otras proteínas de membrana sustrato de metaloproteasas ADAM, como la enzima convertidora de angiotensina-2 (ACE2), también se ha descrito la presencia de un motivo de unión a calmodulina, en este caso en el dominio intracelular de la proteína, a través del cual interactúa con calmodulina impidiendo su proteólisis por ADAM17 (Lambert *et al.*, 2008).

El éster de forbol PMA es uno de los compuestos que estimula la liberación proteolítica de los fragmentos solubles de proteínas de membrana catalizado por las ADAMs. En numerosos estudios se ha descrito que la metaloproteasa ADAM17 es la responsable de la proteólisis inducida por dicho compuesto que implica la activación de la proteína quinasa C (revisado en Edwards *et al.*, 2008). El tratamiento de las BBMV de *L. decemlineata* con PMA no produjo efecto alguno sobre la proteólisis de la toxina Cry3Aa (Figura 22C), lo cual sugiere que la metaloproteasa ADAM asociada a las BBMV de *L. decemlineata* no es un homólogo de ADAM17, o que en nuestras condiciones no tiene lugar dicho efecto

de inducción de la proteólisis. De manera similar, tanto el compuesto organomercurio APMA, que activa metaloproteasas latentes induciendo la pérdida de la región inhibidora pro-péptido de la enzima (Merlos-Suárez *et al.*, 2001; Allinson *et al.*, 2004; Sanderson *et al.*, 2005) como los inductores de la entrada de calcio al interior de la célula ionomicina y A23187 (Sanderson *et al.*, 2005; Nagano *et al.*, 2004) tampoco produjeron efecto alguno en la proteólisis de la toxina Cry3Aa catalizada por las BBMV de *L. decemlineata* (Figura 22C).

2- Compartimentalización de la interacción de la toxina Cry3Aa con proteínas de microdominios de la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata*

Otro de los factores que puede regular la liberación proteolítica de los dominios extracelulares de proteínas transmembrana catalizado por metaloproteasas ADAM es la localización de la metaloproteasa así como de sus sustratos en determinadas regiones de la membrana plasmática. Se ha descrito que la disminución del colesterol celular, con la consiguiente alteración de la estructura y la función de los *lipid rafts* provoca un aumento en la liberación de la fracción soluble de la proteína precursora del péptido β -amiloides no amilodogénica (sAPP α) catalizada por ADAM10 (Kojro *et al.*, 2001) así como de la proteína CD30 catalizada por ADAM17 (von Tresckow *et al.*, 2004). Ambos grupos de autores propusieron que la desestabilización de los *lipid rafts* permite la interacción de la metaloproteasa con sus sustratos en una misma región de la membrana plasmática. Igualmente, la extracción de colesterol celular utilizando MCD aumenta significativamente la liberación proteolítica del fragmento soluble del receptor de interleuquina-6 (IL-6R) catalizada por ADAM17 y ADAM10 (Matthews *et al.*, 2003) y de la proteína colágeno XVII catalizada por ADAM17 (Zimina *et al.*, 2005). Por el contrario, se ha descrito que la integridad de los *rafts* es necesaria para el procesamiento proteolítico de la proteína neuroregulina por la metaloproteasa ADAM19 o meltrina β , ya que tanto la proteasa como el sustrato se localizan en los *lipid rafts* de la membrana (Wakatsuki *et al.*, 2004). En ese sentido, Tellier *et al.* (2006) mostraron que la metaloproteasa ADAM17 madura y sus sustratos TNF, TNFR1 y TNFR2 también se localizan en los *lipid rafts*. No obstante, estos autores describieron que la eliminación de colesterol en presencia de MCD aumenta la liberación proteolítica

de los fragmentos solubles de dichos sustratos (Tellier *et al.*, 2006, 2008). Otros autores han demostrado que la metaloproteasa ADAM17 se localiza fuera de los *lipid rafts* y que la liberación del fragmento soluble de la proteína p75^{NTR}, que se localiza en los *rafts*, se incrementa en presencia del compuesto extractor de colesterol MCD (Gil *et al.*, 2007). Recientemente Parr-Sturgess *et al.* (2010) han señalado que la liberación proteolítica del fragmento extracelular de la proteína jagged1 es catalizada por ADAM17 y que dicho evento no está asociado a los *lipid rafts*, puesto que ni la metaloproteasa ni el sustrato se localizan en dicha región de la membrana. Aunque la localización de algunos miembros de la familia de las ADAM en una región de la membrana u otra es un tema controvertido, en la mayoría de los casos se ha observado que la presencia de la metaloproteasa y sus sustratos en una misma región de la membrana facilita la proteólisis.

El tratamiento de las BBMV de *L. decemlineata* con el compuesto que extrae colesterol MCD produjo una drástica disminución en el procesamiento proteolítico de Cry3Aa (Figura 22B) que indica que la integridad de los *lipid rafts* de la membrana del epitelio intestinal es clave para que la toxina sea procesada por las proteasas para las que es sustrato. Para otras toxinas bacterianas, como la toxina del cólera y la toxina del tétanos, los *lipid rafts* constituyen el portal de entrada a las células diana (Wolf *et al.*, 1998; Herreros *et al.*, 2001), y en el caso de la toxina Cry1Ac de Bt, se ha descrito que la toxina se asocia con *lipid rafts* aislados de BBMV de *Heliothis virescens* (Zhuang *et al.*, 2002).

Con el objetivo de localizar la actividad metaloproteasa, probablemente de tipo ADAM, que proteoliza la toxina Cry3Aa en la membrana del epitelio intestinal, se llevó a cabo la incubación de Cry3Aa con las fracciones insoluble (*rafts*) y soluble (*non-rafts*) en Tritón X-100 de células disociadas del epitelio intestinal (MECs) de *L. decemlineata*. Aunque ambas fracciones produjeron la proteólisis de Cry3Aa (Figura 35), sólo la fracción soluble de las MECs originó un fragmento de toxina de 30 kDa cuya formación se inhibió específicamente en presencia del inhibidor de metaloproteasas 1,10-fenantrolina (Figura 36, carrera +S), indicando que la actividad metaloproteasa que proteoliza Cry3Aa se localiza en la fracción soluble de las MECs (*non-rafts*) y no en los *lipid rafts*.

En cuanto a las cisteín proteasas que proteolizan Cry3Aa, la incubación de la toxina con las fracciones insoluble y soluble de las MECs en presencia de E64 no produjo inhibición alguna en el procesado proteolítico de Cry3Aa (Figura 36), lo cual podría deberse a que las elevadas concentraciones de sacarosa presentes en dichas fracciones interfieren en el efecto inhibitorio del compuesto.

Resulta interesante destacar que las masas moleculares aparentes de los fragmentos de Cry3Aa de bajo peso molecular generados por las BBMV íntegras (Figura 35, carrera +BBMV) y por la fracción soluble de las MECs (Figura 35, carrera +S) son diferentes. Las BBMV procesan la toxina hasta un fragmento de tamaño de 26 kDa, en tanto que el fragmento más pequeño producido por la actividad metaloproteasa en la fracción soluble es de 30 kDa, sugiriendo que sólo se obtiene el fragmento de 26 kDa cuando tanto las proteínas de la fracción soluble como de la insoluble interactúan con Cry3Aa. La inhibición del procesado proteolítico de la toxina catalizado por las BBMV observada en presencia del compuesto extractor de colesterol MCD (Figura 22B), apoya que la interacción de la toxina Cry3Aa con algún componente localizado en los *lipid rafts* de la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata* podría ser un evento necesario como paso previo a la proteólisis de la toxina catalizada por la actividad metaloproteasa de tipo ADAM que se localiza en la región de la membrana *non-rafts*.

Por ello, cabe sugerir que la diferencia de la masa molecular del fragmento de Cry3Aa producido por las BBMV (26 kDa) y la del originado por la fracción soluble de las MECs (30 kDa) podría deberse a que tiene lugar un cambio en la conformación de la toxina producto de la interacción entre Cry3Aa y algún componente de los *lipid rafts*, antes de que tenga lugar la proteólisis de la toxina catalizada por la actividad metaloproteasa localizada en la región de la membrana *non-rafts*. Este cambio conformacional podría exponer una región de la toxina por la que se proteoliza por la metaloproteasa, originando un fragmento de 30 kDa, en lugar del fragmento de 26 kDa que se genera cuando no tiene lugar dicho cambio conformacional.

Para confirmar la interacción de Cry3Aa con proteínas localizadas tanto en las fracciones insoluble (*lipid rafts*) como soluble (*non-rafts*) de MECs de *L. decemlineata*, analizamos mediante *Ligand blot* la unión de la toxina Cry3Aa a

proteínas localizadas en ambas regiones de la membrana. En la fracción soluble, principalmente detectamos la unión de la toxina a una banda de 36 kDa y a proteínas de alrededor de 200 kDa (Figura 28 A, carrera S). En la fracción que contenía los *lipid rafts* también se inmunodetectó la unión de Cry3Aa a una banda de masa molecular aparente de 36 kDa (Figura 28 A, carrera I). El análisis por SDS-PAGE y espectrometría de masas de algunas de las proteínas a las que se une la toxina Cry3Aa (Figura 28B) mostró la presencia de mezclas complejas en las bandas analizadas (Tabla 5), sugiriendo la conveniencia de su separación mediante una técnica de mayor resolución. El elevado y variado número de proteínas identificadas podría deberse a la ausencia de secuencias de proteínas de *L. decemlineata* en las bases de datos, lo cual origina que se identifiquen sobre todo proteínas altamente distribuidas y muy abundantes, aunque la similitud con la información de espectrometría de masas no sea tan elevada.

Es necesario señalar que aunque la separación de las fracciones insoluble (*rafts*) y soluble (*non-rafts*) de las MECs se basó en la identificación de la isoforma anclada a GPI de fasciclina, que es un marcador de *lipid rafts*, en la fracción insoluble de las MECs y de la isoforma transmembrana de fasciclina en la fracción soluble, algunas de las proteínas analizadas se encontraron en ambas fracciones, indicando que pueda tratarse de proteínas que se localizan en ambas regiones de la membrana o que no haya sido posible separarlas mediante el procedimiento utilizado.

En el análisis de las proteínas de las fracciones insoluble y soluble de las MECs a las que se une Cry3Aa, resultó particularmente interesante la identificación de proteínas de unión del epitelio intestinal cuya interacción con Cry3Aa habíamos detectado en otras experiencias. La aparición de dichas interacciones mediante aproximaciones experimentales diferentes confirma la identificación de estas proteínas de las bandas en las que se detectó la unión de Cry3Aa.

En la fracción insoluble (*rafts*) de las MECs se inmunodetectó la unión de Cry3Aa en la banda I-37.2 de masa molecular aparente de 36 kDa (Tabla 5), en la que encontramos homología con las proteínas aldehído reductasa de *C. quinquefasciatus* y prohibitina-2 de *Tribolium castaneum*. La proteína aldehído reductasa la hemos identificado como posible proteína de unión a Cry3Aa, mediante la utilización de un agente de entrecruzamiento, en una proteína de

BBMV a la que se une la toxina Cry3Aa (Tabla 2). La proteína prohibitina-2 también las identificamos en las bandas S-37.1 y S-37.2 de la fracción soluble de las MECs.

En la fracción soluble (*non-rafts*) de las MECs se detectó por *Ligand blot* la unión de la toxina Cry3Aa a una banda de aproximadamente 30 kDa (Fig 28B, carrera S), en la cual se encontró homología con las proteínas prohibitina-1 de varios insectos (banda S-30.1, Tabla 5) que pertenecen a la misma familia que prohibitina-2, y con las que también hemos encontrado similitud de secuencia en una mancha de aproximadamente 30 kDa que corresponde a una proteína de las BBMV que interactúa con la toxina Cry3Aa en condiciones nativas (Figuras 11 y 12, Tabla 2).

En esta fracción, en la banda 40.1 se identificó una proteína con homología a actina 5C de *Apis mellifera*, proteína similar a su ortóloga en *D. melanogaster* que también se ha identificado entre las proteínas del epitelio intestinal de *L. decemlineata* que quedaron retenidas en una matriz con calmodulina inmovilizada (Tabla 4). Igualmente, en la banda S-37.2 de la fracción soluble de las MECs se identificó una proteína similar a actina A3 de *Bombyx mori*, cuya ortóloga en *Helicoverpa armígera* se ha identificado entre las proteínas de BBMV que quedaron retenidas en una matriz que contenía el péptido pep-rec inmovilizado (Tabla 3).

De manera general, el análisis de la unión de la toxina Cry3Aa a proteínas de los microdominios de la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata* evidencia que de modo similar a como ocurre con otras toxinas Cry de Bt, como la toxina Cry1Ab, la cual es reconocida por los receptores APN y ALP presentes en *lipid rafts* y por el receptor tipo caderina localizado fuera de estos microdominios (revisado en Soberón *et al.*, 2009), la toxina Cry3Aa se une tanto a proteínas de *lipid rafts* como a proteínas de la región *non-rafts*. Para la toxina Cry1Ab, su interacción con ambos tipos de receptores, y en consecuencia con ambas regiones de la membrana, es necesaria para la toxicidad (revisado en Soberón *et al.*, 2009). En el caso de la toxina Cry3Aa, probablemente también su interacción con proteínas localizadas en ambas regiones de la membrana del epitelio intestinal pueda ser necesaria en su modo de acción en *L. decemlineata*.

Una o varias de las proteínas identificadas en la banda de 36 kDa de la fracción insoluble de las MECs, en la que se detectó la unión de la toxina Cry3Aa, podría ser el o los componentes de los *rafts* de la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata* con los que interactúa la toxina Cry3Aa previamente a ser proteolizada por la actividad metaloproteasa, probablemente de la familia de las ADAM, localizada fuera de estos microdominios.

En la región *non-rafts*, la toxina Cry3Aa se une sobre todo a proteínas del citoesqueleto, como actina, espectrina (banda 250.1) y miosina (banda 250.2) (Tabla 5) y en ella se localizan la o las metaloproteasas, probablemente de la familia de las ADAM, para la que Cry3Aa es sustrato.

3- Proteínas de la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata* que interaccionan con la toxina Cry3Aa

La interacción de las toxinas Cry con sus receptores en las células del epitelio intestinal del insecto diana es un evento determinante en su especificidad y puede estar directamente implicada en la toxicidad. En el mecanismo de acción general de las toxinas Cry de Bt fundamentalmente se han identificado dos clases de receptores, la proteína de integral de membrana tipo caderina, y los receptores APN y ALP, anclados a la membrana de los *lipid rafts* a través de un residuo GPI (Soberón *et al.*, 2009)

Recientemente se ha propuesto que los receptores APN y ALP están implicados en dos etapas diferentes en el modo de acción de la toxina Cry1Ab en *M. sexta* (Pacheco *et al.*, 2009; Arenas *et al.*, 2010). En una primera etapa, actúan como sitios de unión muy abundantes y de baja afinidad que localizan y concentran el monómero de la toxina en la vecindad de las microvellosidades, antes de su interacción con el receptor tipo caderina, localizado en la región *non-rafts*, y posteriormente como receptores secundarios de elevada afinidad que median la inserción del oligómero en los *lipid rafts* de la membrana del epitelio intestinal (Pacheco *et al.*, 2009; Arenas *et al.*, 2010).

En el presente trabajo no hemos encontrado proteína alguna con homología a los receptores APN y ALP. No obstante, la identificación mediante diferentes estrategias experimentales de proteínas de BBMV y de células disociadas del epitelio intestinal con homología a prohibitinas -1 y -2 de otros insectos, proteínas cuya localización en los *lipid rafts* ha sido descrita por varios grupos de investigadores, permite postular que en el modo de acción de la toxina Cry3Aa en *L. decemlineata* las prohibitinas podrían tener una función análoga a la que poseen las proteínas APN y ALP en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1A en lepidópteros. De acuerdo con este postulado, Bayyareddy *et al.* (2009) también han sugerido que la prohibitina-1 de BBMV de *A. aegypti*, a la que se une la toxina Cry4Ba, podría colocalizar con las proteínas APN y ALP, ancladas a la membrana a través de un residuo GPI, en los *lipid rafts*. del borde en cepillo del epitelio intestinal, evidenciándose que la implicación de proteínas de tipo prohibitina en el modo de acción de algunas toxinas Cry de Bt podría ser un paso cuya relevancia está todavía por elucidar.

Las prohibitinas pertenecen a la superfamilia de la denominada Banda-7, integrada por las familias de proteínas estomatina, prohibitina, flotilina y HflK/C que comparten el dominio altamente conservado SPFH (*Stomatin/Prohibitin/Flotillin/HflK/C*). La familia de las prohibitinas comprende las proteínas evolutivamente conservadas prohibitina-1 (PHB1) y prohibitina-2 (PHB2), también denominadas BAP32 y BAP37, respectivamente, las cuales comparten más de un 50% de identidad en sus estructuras aminoacídicas (revisado en Osman *et al.*, 2009). Estas proteínas poseen una topología similar compuesta por un dominio N-terminal transmembrana, un dominio prohibitina (PHB), el cual facilita su localización en los *lipid rafts* (Morrow y Parton, 2005) y un dominio *coil-coiled* en el extremo C-terminal (Winter *et al.*, 2007).

La localización de las prohibitinas en los *lipid rafts* ha sido referida por varios grupos de investigadores, ya que se han aislado de *lipid rafts* derivados de preparaciones de membranas fagosomales (Garin *et al.*, 2001), de membranas celulares y partículas lipídicas de adipocitos (Brasaemle *et al.*, 2004) y se han identificado en un análisis proteómico a gran escala de proteínas de *lipid rafts* (Foster *et al.*, 2003). Para el caso de la prohibitina-1 humana, se ha descrito que su

translocación a la membrana plasmática y su interacción con proteínas presentes en los *lipid rafts* está mediada por su palmitoilación (Ande y Mishra, 2010), mientras que para la prohibitina-1 del parásito *Leishmania donovani*, se ha encontrado que la proteína está anclada a la membrana a través de un residuo GPI (Jain *et al.*, 2010), modificación postraduccional que probablemente facilita su presencia en estos microdominios de la membrana (Brown *et al.*, 2006). Dada la localización preferencial de las prohibitinas en los *lipid rafts*, es posible postular que las proteínas de *L. decemlineata*, o al menos algunas de las proteínas, a las que se une la toxina Cry3Aa en la fracción insoluble de las MECs (Figura 28A, carrera I) podrían ser las prohibitinas -1 y -2.

Las prohibitinas son proteínas de membrana altamente conservadas desde el punto de vista evolutivo, ampliamente distribuidas y presentes en diferentes compartimentos celulares. Aunque fundamentalmente se han identificado en las mitocondrias, también se localizan en el núcleo y en la membrana plasmática (revisado en Mishra *et al.*, 2010). Estas proteínas están implicadas en numerosas funciones tales como la regulación de la transcripción, la senescencia y la señalización celular, la apoptosis, y la biogénesis y regulación de la función de las mitocondrias (revisado en Osman *et al.*, 2009 y Mishra *et al.*, 2010). La ausencia de prohibitinas provoca fenotipos severos y deficiencias en eucariotas superiores, indicando que dichas proteínas desempeñan funciones de gran relevancia (revisado en Osman *et al.*, 2009).

Las funciones de las prohibitinas derivadas de su localización en la membrana plasmática, que podrían ser las de mayor interés en el análisis de su interacción con la toxina Cry3Aa, están fundamentalmente relacionadas con la transducción de señales. En un inicio, su participación en esta clase de eventos fue propuesta a raíz de la asociación observada de PHB1 y PHB2 con el receptor de IgM en células B (Terashima *et al.*, 1994).

Recientemente se ha descrito que las prohibitinas interactúan directamente con receptores presentes en la membrana plasmática como la proteína Raf o el receptor de la insulina, así como que están implicadas en varias rutas de señalización celular que regulan procesos biológicos esenciales como el metabolismo, la proliferación celular y el desarrollo, y que son proteínas importantes en la interconexión entre

dichas rutas de señalización (revisado en Mishra *et al.*, 2010). Considerando lo anteriormente señalado, así como que algunos investigadores han propuesto que la toxina Cry1Ab ejerce su acción tóxica en lepidópteros a través de una cascada de señalización celular desencadenada por su interacción con el receptor tipo caderina, que produce la muerte celular por oncosis (Zhang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006), cabe sugerir que en el modo de acción de la toxina Cry3Aa en *L. decemlineata*, la interacción de Cry3Aa con prohibitinas podría desencadenar rutas de señalización celular que estén implicadas en la toxicidad generada en este insecto.

Además de su participación en los procesos antes mencionados, las prohibitinas pueden estar implicadas en la interacción de componentes estructurales de patógenos con las células hospedadoras, influyendo en su virulencia. En ese sentido, se ha descrito que el polisacárido capsular Vi de *Salmonella typhi* interactúa con un complejo formado por las proteínas prohibitina-1 y -2 asociado a la superficie celular de un modelo humano de células epiteliales del intestino, suprimiendo la respuesta inflamatoria temprana. Tanto el complejo compuesto por PHB1 y PHB2, como el factor de virulencia Vi, se localizan en los *lipid rafts* (Sharma y Qadri, 2004). De manera similar, Emerson *et al.* (2010) identificaron la interacción de un heterodímero formado por las prohibitinas-1 y -2 con el dominio C-terminal citoplasmático de la glicoproteína del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). Estos autores demostraron que dicha interacción es específica y resulta importante para la expansión replicativa del virus en algunos tipos de células T.

Por otra parte, en el parásito *L. donovani* se ha descrito que la presencia de la proteína prohibitina-1 en la superficie del polo aflagelado, región a través de la cual tiene lugar la interacción huésped-parásito, está directamente relacionada con la infectividad. Como un caso particular en la familia de las prohibitinas, la prohibitina-1 de *L. donovani* está anclada a la membrana a través de un residuo GPI y dicha modificación postraduccional es clave para la interacción con las células del huésped (Jain *et al.*, 2010). De modo semejante a lo que ocurre con los patógenos mencionados, la unión de la toxina Cry3Aa a las prohibitinas presentes en el epitelio intestinal de *L. decemlineata* podría estar implicada en el mecanismo de acción tóxica de Cry3Aa en dicho insecto.

La presencia de la proteína prohibitina-1 en el epitelio intestinal de *L. decemlineata* no sólo la determinamos mediante el análisis por espectrometría de masas, sino que además la confirmamos con la utilización de un anticuerpo generado contra un fragmento del extremo C-terminal de la prohibitina-1 humana. Inmunodetectamos una banda de masa molecular aparente de 29 kDa, valor que se aproxima a la masa molecular calculada de la prohibitina-1, confirmando así la presencia de esta proteína en las fracciones solubles e insolubles de las MECs de *L. decemlineata* (Figura 32).

Adicionalmente, demostramos la expresión del gen de prohibitina-1 en el epitelio intestinal de *L. decemlineata* mediante la amplificación por RT-PCR de un fragmento de ADN (Figura 33) que presentaba homología con genes que codifican para la proteína prohibitina-1 en varios insectos, lo cual corrobora la presencia de esta proteína en *L. decemlineata*, descrita por primera vez en el presente trabajo. La traducción *in silico* de dicho fragmento de ADN originó un segmento proteico cuya secuencia contiene un gran número de los péptidos (Figura 34) que habíamos identificado previamente en proteínas de BBMV y MECs a las que se unió la toxina Cry3Aa.

Se ha descrito que las prohibitinas pueden interactuar con otras proteínas, también presentes en los *lipid rafts*, tales como la anexina, la cual también la hemos identificado por homología de secuencia en proteínas inmunodetectadas con Cry3Aa de las fracciones insoluble y soluble de las MECs (Tabla 5). Se ha propuesto que las anexinas desempeñan un papel clave en la organización de los *lipid rafts* en la membrana plasmática (Babiychuk y Draeger, 2000; Foster *et al.*, 2003). En relación a la interacción entre estas proteínas, Bacher *et al.* (2002) describieron que en una línea de células B murinas, las prohibitinas-1 y -2 formaron homo y heteroligómeros de alto peso molecular en los que ambas proteínas interactuaron con α -actinina y anexina A2. Dado que en las fracciones insoluble y soluble de las MECs, en bandas correspondientes a proteínas a las que se unió la toxina Cry3Aa encontramos homología con las proteínas prohibitinas-1 y -2 y también con anexina IX de *T. castaneum* (banda I-37.3, fracción insoluble) y de *Nasonia vitripennis* (banda S-37.3, fracción soluble) (Tabla 5), y que tanto la prohibitina-2 como la anexina IX poseen masas moleculares calculadas de

aproximadamente 36 kDa, valor que coincide con la masa molecular aparente de la banda de la fracción insoluble de las MECs (Figura 28 A, carrera I) en la que se inmunodetectó la unión de Cry3Aa, podemos sugerir que en los *lipid rafts* de la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata* ambas proteínas también podrían formar parte de un complejo, al cual se une la toxina Cry3Aa.

Dado que la anexina es una proteína organizadora de la interfaz entre los *lipid rafts* y el citoesqueleto de actina, a través de su unión directa a actina y espectrina (Gerke y Moss, 2002), la unión de la toxina Cry3Aa al complejo formado por prohibitinas y anexina también podría facilitar la interacción de Cry3Aa con proteínas del citoesqueleto de actina localizadas en las proximidades de la región intracelular de los *lipid rafts* de la membrana plasmática de las células del epitelio intestinal.

Se ha descrito que la anexina también puede interactuar con proteínas de la familia RACK1 (Corsini *et al.*, 2005), ambas proteínas, junto a la prohibitina-2, que también interactúa con anexina (Bacher *et al.*, 2002), las hemos identificado en bandas de la fracción insoluble de las MECs (bandas I-37.2 e I-37.3, Tabla 5) que podría corresponder a la banda en que detectamos la unión de Cry3Aa (Figura 28A, carrera I). La referida interacción entre estas proteínas, nos permite proponer que la toxina Cry3Aa se une a un complejo formado por miembros de al menos estas tres familias de proteínas en los *lipid rafts* del epitelio intestinal de *L. decemlineata*. Esta interacción podría contribuir a aumentar la concentración de Cry3Aa en las microvellosidades intestinales, posibilitando su interacción en la región extracelular de la membrana con otras proteínas localizadas en la vecindad de los dominios ricos en colesterol, como la metaloproteasa ADAM.

Inmunodetectamos con Cry3Aa proteínas con homología a RACK1 tanto en la fracción insoluble como en la soluble de MECs de *L. decemlineata*. En las bandas I-37.2 e I-37.3 de la fracción insoluble identificamos proteínas con homología a RACK1 de *H. virescens* y *Plutella xylostella*, respectivamente. En la banda S-37.2 de la fracción soluble encontramos homología con la proteína RACK1 de *H. virescens*.

La proteína RACK1 fue originalmente descrita como el receptor intracelular para la proteína quinasa C activada (Ron *et al.*, 1994). Es una proteína *scaffold* o de andamiaje que coordina la interacción entre proteínas clave en procesos de señalización en la membrana celular y en otros orgánulos intracelulares. Posee en su estructura primaria repeticiones WD (Trp-Asp) a través de las cuales interactúa con otras proteínas. Desde el punto de vista evolutivo es una proteína muy conservada que está presente en levaduras, plantas, insectos y mamíferos (revisado en McCahill *et al.*, 2002).

La activación de la proteína quinasa C (PKC) por compuestos como el éster de forbol PMA es uno de los estímulos que induce la liberación de los fragmentos solubles de proteínas de membrana, catalizado por metaloproteasas de la familia de las ADAM (revisado en Reiss y Saftig, 2009). En la inducción de dicho proceso catalítico están implicadas varias rutas de señalización y proteínas, entre las que puede encontrarse la proteína RACK1.

Bourd-Boittin *et al.* (2008) describieron que la interacción entre la proteína RACK1 y la metaloproteasa ADAM12 media la translocación de ADAM12 dependiente de la proteína quinasa C (PKC) a la membrana plasmática, donde tiene lugar su actividad proteolítica. Tanto ADAM12 como RACK1 se localizan en estructuras intracelulares de tipo vesicular y parcialmente distribuidas en la membrana plasmática. El tratamiento con ésteres de forbol aumenta la localización de ADAM12 en las fracciones de membrana y produjo la coinmunoprecipitación de complejos ternarios compuestos por ADAM12, RACK1 y PKC (Bourd-Boittin *et al.*, 2008). Dichos resultados llevaron a los autores a sugerir que RACK1 actúa como una proteína adaptadora que media la interacción entre PKC y la metaloproteasa ADAM12 (Bourd-Boittin *et al.*, 2008).

La presencia de un elevado número de péptidos con homología a ortólogas de RACK1 en *H. virescens* y *P. xylostella*, en proteínas de los *lipid rafts* del epitelio intestinal de *L. decemlineata*, indica que en este insecto podría existir una proteína similar, también con función adaptadora, que mediase en la interacción entre la toxina Cry3Aa y la metaloproteasa ADAM.

En cuanto a la unión de la toxina Cry3Aa a la metaloproteasa ADAM para la que es sustrato, es necesario señalar que en el presente trabajo no ha sido posible identificar miembro alguno de dicha familia de metaloproteasas entre las proteínas del epitelio intestinal a las que se une Cry3Aa, posiblemente debido a que no existen secuencias de metaloproteasas ADAM de *L. decemlineata* depositadas en las bases de datos y a que la homología en la estructura primaria entre los miembros de esta familia de proteínas es baja. La identificación de la unión de la toxina Cry3Aa a proteínas cuya interacción con metaloproteasas ADAM se ha descrito, tales como RACK1 y también proteínas 14-3-3, sugiere que la interacción de Cry3Aa con la metaloproteasa ADAM podría estar mediada por la unión previa de la toxina a otras proteínas.

Hemos identificado, por homología de secuencia, proteínas 14-3-3 en un análisis por SDS-PAGE y espectrometría de masas de proteínas del sobrenadante de BBMV eluidas de una matriz que contenía el péptido pep-rec inmovilizado (Figura 21), péptido que representa la región a través de la cual la toxina Cry3Aa es reconocida por la metaloproteasa ADAM. La masa molecular aparente de la proteína fue de alrededor de 30 kDa y presentaba homología a las isoformas Epsilon y Zeta de la proteína 14-3-3 de *D. melanogaster* (Tabla 3).

Se ha descrito que varios miembros de la familia de proteínas 14-3-3 interactúan con la metaloproteasa ADAM22 a través de su unión a los motivos consenso RSNSWQ (aa831-836) y RSNSTE (aa854-859), presentes en el dominio citoplasmático de esta metaloproteasa (Zhu *et al.*, 2003; 2005 y Gødde *et al.*, 2006) y que dicha interacción regula el transporte de ADAM22 a la membrana plasmática (Gødde *et al.*, 2006).

Las proteínas 14-3-3 constituyen una familia altamente conservada y ampliamente distribuida en todas las células eucariotas, que son particularmente abundantes en el cerebro. Estas proteínas se unen y regulan moléculas clave involucradas en varios procesos tales como la señalización intracelular, el control del ciclo celular, la apoptosis, la regulación de la transcripción, el desarrollo del cerebro, así como procesos de adhesión y proliferación (Zhu *et al.*, 2003 y Gødde *et al.*, 2006).

Resulta interesante destacar que en un análisis proteómico de proteínas de las BBMV de *A. aegypti* también se identificaron isoformas de la proteína 14-3-3 (Popova-Butler y Dean, 2009). Aunque en este trabajo no se detectó proteína alguna de la familia de las ADAM, ni se analizó la unión de toxinas Cry, la presencia de proteínas pertenecientes a esta familia, en la membrana del epitelio intestinal de otros insectos susceptibles a toxinas Cry de Bt, es coherente con la identificación de esta proteína en el epitelio intestinal de *L. decemlineata*.

En este trabajo, a través de diversas aproximaciones experimentales hemos comprobado que la toxina Cry3Aa interactúa con la proteína actina (Tablas 3, 4 y 5). La interacción de la toxina Cry3Aa con actina, localizada en las proximidades de la región citoplasmática de la membrana celular, podría favorecerse por la inserción y formación de poro de la toxina en la membrana y por la unión de Cry3Aa a complejos en los que se encuentra anexina, proteína que interactúa con actina (Gerke y Moss, 2002).

La unión de toxinas Cry de Bt a actina del epitelio intestinal de insectos fue inicialmente señalada por McNall y Adang, (2003) quienes mediante la combinación de análisis proteómico y *Ligand blot* describieron la unión de la toxina Cry1Ac a actina de las BBMV de *M. sexta*. Siguiendo estrategias similares, también se ha comprobado la unión de la toxina Cry1Ac a actina presente en las BBMV de *H. virescens* (Krishnamoorthy *et al.*, 2007) y *Helicoverpa armigera* (Chen *et al.*, 2009), y de la toxina Cry4Ba a actina de las BBMV de *A. aegypti* (Bayyareddy *et al.*, 2009). La reiterada identificación de la unión de toxinas Cry a actina de diferentes insectos y los resultados obtenidos por Candas *et al.* (2003), quienes describieron la alteración de los niveles de actina en una población de *Plodia interpunctella* resistente a la toxina Cry1Ac, en comparación con los de la población sensible, han hecho que en la actualidad la actina se considere como una de las proteínas implicadas en el mecanismo de acción tóxica de las toxinas Cry de Bt (revisado en Pigott y Ellar, 2007).

En el presente trabajo se refiere por primera vez la interacción de la toxina Cry3Aa con actina asociada en la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata*.

La actina es una proteína del citoesqueleto que posee una asociación dinámica con la membrana plasmática (Schlichting *et al.*, 2006). Generalmente forma arreglos ordenados con otras proteínas y sirve de soporte a la superficie apical del borde en cepillo en el intestino (Mooseker, 1985).

La localización intracelular de la actina hizo que en un principio su interacción con toxinas Cry resultara sorprendente (McNall y Adang, 2003), llegándose incluso a sugerir (Bayyareddy *et al.*, 2009) que esta interacción tendría lugar si se produjese la inserción total de las toxinas a través de la membrana plasmática, tal y como ha sido propuesto por Nair y Dean, (2008) para las toxinas Cry1A, lo cual expondría regiones de la toxina en el citoplasma que permitirían la interacción con actina. También se ha señalado que la interacción entre las toxinas Cry y la actina podría estar relacionada con la unión al receptor tipo caderina (McNall y Adang, 2003; Bayyareddy *et al.*, 2009). En *D. melanogaster* la caderina se encuentra indirectamente unida al citoesqueleto de actina (Pacquelet *et al.*, 2003) y en otros eucariotas se ha descrito la formación de un complejo caderina-catenina dinámicamente unido a actina e involucrado en el mantenimiento de la arquitectura del citoesqueleto. Se ha propuesto que el contacto de las toxinas Cry con actina podría provocar alteraciones en las uniones del citoesqueleto que causen la pérdida de la forma y la integridad de las células (Shimada *et al.*, 2001; Woods *et al.*, 1997).

En nuestro caso, la unión de la toxina Cry3Aa a actina en el epitelio intestinal de *L. decemlineata* podría estar favorecida por la interacción de Cry3Aa con otras proteínas también asociadas al epitelio intestinal, para las que se ha descrito que interactúan con actina. Tal es el caso de la proteína anexina, cuya interacción con Cry3Aa y actina hemos señalado en este apartado, de la proteína calmodulina y de la metaloproteasa ADAM.

Se ha descrito que la calmodulina está presente en las membranas del borde en cepillo aisladas de células epiteliales del intestino, donde constituye uno de los componentes mayoritarios del haz de fibras de las microvellosidades, junto con otras proteínas del citoesqueleto como actina, fimbrina, vilina, miosina y espectrina (Brown y McKnight, 2010). En este trabajo hemos comprobado que la toxina Cry3Aa se une específicamente a calmodulina (Figura 24), y que a su vez, la

calmodulina interactúa con actina del epitelio intestinal de *L. decemlineata* (Figura 26, Tabla 4). Por tanto, es posible postular que la unión de Cry3Aa a calmodulina podría posibilitar la interacción de Cry3Aa con actina y potencialmente desestabilizar el citoesqueleto. En ese sentido, también hemos identificado la unión de la toxina Cry3Aa a otras proteínas del citoesqueleto localizadas en la región de la membrana *non-rafts*. En las bandas 250.1 y 250.2 de la fracción soluble de las MECs identificamos un elevadísimo número de péptidos con homología a la proteína espectrina y a la cadena pesada de miosina de *T. castaneum*, respectivamente (Tabla 5). La unión de Cry3Aa a varias proteínas del citoesqueleto del epitelio intestinal de *L. decemlineata* revela que dichas interacciones podrían estar implicadas en el modo de acción de la toxina Cry3Aa en el escarabajo de la patata, tal y como ha sido propuesto tenga lugar para otras toxinas Cry en sus insectos diana (Jurat-Fuentes y Adang, 2006).

Por otra parte, se ha propuesto que la metaloproteasa ADAM10 podría ser un receptor de elevada afinidad para la toxina α -hemolisina (Hla) de *Staphylococcus aureus* y se ha demostrado que el complejo formado por la toxina y la metaloproteasa (Hla-ADAM10) causa alteraciones en cascadas de señalización celular que desestabilizan las adhesiones focales y el citoesqueleto de actina, provocando perturbaciones en las barreras celulares que contribuyen a aumentar la patogenicidad (Wilke y Bubeck Wardenburg, 2010). De manera análoga, la unión de la toxina Cry3Aa a la metaloproteasa ADAM también podría producir alteraciones en las adhesiones focales y el citoesqueleto de actina en las células del epitelio intestinal, lo cual podría favorecer la interacción de algunas regiones de la toxina con actina, localizada en las proximidades de la región interna de la membrana, desencadenando eventos implicados en la citotoxicidad, probablemente relacionados con la alteración de la dinámica del citoesqueleto.

La interacción de la toxina Cry3Aa con proteínas del citoesqueleto también podría favorecer su unión a otras proteínas localizadas en la cara citoplasmática de la región *non-raft* de la membrana, como la proteína V-ATPasa, que se ha descrito que actúa como proteína de anclaje del citoesqueleto de actina en la membrana de células globulares del epitelio intestinal de *M. sexta* (Vitavska *et al.*, 2005).

En el presente trabajo se describe por primera vez la interacción de la toxina Cry3Aa con proteínas con homología a V-ATPasa en el epitelio intestinal de *L. decemlineata*. En las bandas 40.3 y S-30.3 de la fracción soluble de las MECs (Tabla 5) identificamos proteínas con homología a la subunidad C de la V-ATPasa de *T. castaneum* y a la subunidad E de dicha proteína en *M. sexta*, respectivamente.

Varios investigadores han referido la unión de toxinas Cry a la proteína V-ATPasa en diferentes insectos. Se ha descrito que la toxina Cry1Ac se une a la subunidad A de la V-ATPasa de BBMV de *H. virescens* (Krishnamoorthy *et al.*, 2007) y a la subunidad B de la V-ATPasa de BBMV de *H. armigera* (Chen *et al.*, 2009). Así como también se ha señalado la unión de la toxina Cry4Ba a las subunidades B y E de la V-ATPasa de BBMV de *A. aegypti* (Bayyareddy *et al.*, 2009).

La proteína V-ATPasa es una enzima compuesta por varias subunidades que desempeñan diversas funciones relacionadas con su ensamblaje, regulación y actividad catalítica. Se localiza en la membrana apical de las células del epitelio intestinal de los insectos, en la que funciona como un transportador electrogénico de H^+/K^+ en la membrana plasmática, representando la fuente de energía primaria para la secreción y la absorción intestinales (Wieczorek *et al.*, 1999). Según los modelos hipotéticos de V-ATPasas, todas las subunidades, desde la A hasta la H se localizan en el lado citoplasmático de la membrana (Beyenbach y Wieczorek, 2006).

Se ha sugerido que la unión de las toxinas Cry de Bt a la V-ATPasa podría estar relacionada con la alteración en el transporte de iones H^+ y K^+ a través de la membrana que produce la desestabilización de los balances iónicos y de pH (Krishnamoorthy *et al.*, 2007), que se ha observado tiene lugar producto de la acción de las toxinas Cry de Bt (Knowles, 1994). En relación al planteamiento anterior, Candas *et al.* (2003) describieron un aumento en los niveles de la proteína V-ATPasa en una población de *P. interpunctella* resistente a la toxina Cry1Ac, en comparación con la población sensible, y señalaron que dicho aumento podía deberse a un efecto que compensase la toxicidad producida como consecuencia de la interferencia en la función de la V-ATPasa originada por la unión de Cry1Ac.

Para el caso de la toxina Cry3Aa, su unión a alguna o varias de las subunidades de una V-ATPasa presente en el epitelio intestinal de *L. decemlineata* también podría contribuir a la acción tóxica de Cry3Aa en el escarabajo de la patata.

En general, la identificación de la unión de la toxina Cry3Aa a las proteínas analizadas en este apartado, localizadas en diferentes dominios de la membrana, tanto en la región extracelular, como en la citoplasmática, corrobora la compartimentalización en la interacción de la toxina Cry3Aa con la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata* y pone de manifiesto la complejidad del modo de acción de Cry3Aa en este insecto.

4- Significado funcional de la interacción de la toxina Cry3Aa con la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata*

Las diferentes etapas que comprenden el modo de acción de las toxinas Cry de Bt están relacionadas entre sí y el resultado de cada una de ellas puede condicionar la siguiente. En el presente trabajo hemos comprobado que como resultado de la interacción de la toxina Cry3Aa con la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata* tiene lugar la proteólisis de la toxina por una o varias metaloproteasas probablemente pertenecientes a la familia de las ADAM y que dicho evento proteolítico es compatible con etapas del modo de acción de Cry3Aa en *L. decemlineata* que tienen lugar previamente a la interacción de la toxina con la membrana.

Se ha sugerido que en el intestino de *L. decemlineata* podría existir una proteasa con actividad proteolítica de tipo quimotripsina o similar, que procese la toxina Cry3Aa facilitando su solubilización en el lumen del intestino y su unión a la membrana del epitelio intestinal (Martínez-Ramírez y Real, 1996; Carroll *et al.*, 1997).

En el presente trabajo hemos comprobado que el procesamiento *in vitro* de la toxina Cry3Aa con quimotripsina, a diferencia de la tripsinización, es compatible con la proteólisis posterior de la toxina por la metaloproteasa ADAM asociada a las BBMV de *L. decemlineata* (Figuras 37 y 38), lo cual indica que la

quimotripsinización no parece alterar las regiones de la toxina implicadas en la interacción con esta metaloproteasa y sugiere que en el modo de acción de la toxina Cry3Aa en *L. decemlineata* puede tener lugar el procesado proteolítico de la toxina tanto por proteasas digestivas de tipo quimotripsina, como por una o varias metaloproteasas de membrana probablemente pertenecientes a la familia de las ADAM.

Hemos observado que la proteólisis de Cry3Aa catalizada por las BBMV se inhibe en presencia del compuesto TPCK (Figura 8), el cual es un inhibidor específico de quimotripsina, aunque también de otras serín y cisteín proteasas. Si bien la quimotripsina es una proteasa digestiva soluble, la inhibición de la proteólisis de Cry3Aa en presencia de este compuesto podría deberse a que en las BBMV podrían quedar retenidas moléculas de esta proteasa que procesasen la toxina Cry3Aa y facilitasen su unión a la membrana del epitelio intestinal.

La interacción de la toxina Cry3Aa con las BBMV de *L. decemlineata* produce un aumento en la capacidad formadora de poros de la toxina *in vitro*, en comparación con la formación de poros de la toxina que no ha estado en contacto con las vesículas (Rausell *et al.*, 2004).

El análisis de la formación de poro *in vitro* de la toxina Cry3Aa quimotripsinizada (Figura 41) evidencia que el procesado quimotriptico, además de no alterar las regiones de la toxina por las que es reconocida por la metaloproteasa ADAM asociada a las BBMV, no afecta las regiones implicadas en la interacción con la membrana del epitelio intestinal que produce el aumento en la capacidad formadora de poros de la toxina *in vitro* descrito previamente. De manera análoga a como sucede con la toxina nativa, la formación de poro de la toxina Cry3Aa quimotripsinizada, previamente incubada con BBMV, resulta mayor que la de la toxina procesada con quimotripsina que no había estado en contacto con las vesículas, e incluso que la de la toxina sin procesar e incubada con BBMV (Figura 41). Estos resultados son compatibles con la participación de una proteasa de tipo quimotripsina, o similar, en el procesado proteolítico de la toxina Cry3Aa, en una etapa previa a su interacción con la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata*, que probablemente podría facilitar la unión de la toxina a dicha membrana.

En el presente trabajo hemos comprobado que la interacción de la toxina Cry3Aa con la metaloproteasa ADAM asociada a las BBMV de *L. decemlineata* es clave para la formación de poro *in vitro* de la toxina. La incubación de Cry3Aa con BBMV en presencia del péptido pep-rec, competidor por el sitio de reconocimiento en Cry3Aa de la metaloproteasa ADAM, produce una marcada disminución en la formación de poros *in vitro* de la toxina (Figura 40), y también la inhibición de la proteólisis de Cry3Aa catalizada por las BBMV (Figura 18B), evidenciando que la interacción de la toxina con la metaloproteasa ADAM es necesaria para la formación de poro *in vitro*, y como resultado de dicha interacción también tiene lugar la proteólisis de la toxina.

Mediante el análisis de la formación de poros *in vitro* de la toxina Cry3Aa incubada con BBMV en presencia del inhibidor de metaloproteasas ácido acetohidroxámico o del péptido pep-99, competidor por los sitios de corte de las proteasas para las que Cry3Aa es sustrato, comprobamos que la inhibición de la proteólisis de la toxina catalizada por las BBMV en presencia de estos compuestos se traduce en un aumento en la capacidad formadora de poros de Cry3Aa, en comparación con la toxina que había sido incubada solo con las BBMV (Figura 39). Estos resultados indican que la proteólisis catalizada por las proteasas asociadas a las BBMV de *L. decemlineata* tiene un efecto negativo en la formación de poros *in vitro* de la toxina Cry3Aa, probablemente porque afecta la integridad de la toxina y disminuye su capacidad para insertarse en la membrana o porque la proteólisis de la toxina insertada desestabiliza la estructura de los poros.

Se ha propuesto que la toxina Cry1Ab en estructura oligomérica se une al receptor aminopeptidasa N, que también es una metaloproteasa, aunque no se ha descrito que proteolice las toxinas Cry, y que esta unión facilita la inserción del oligómero en la membrana y la formación de poros (Bravo *et al.*, 2004). De manera análoga, en *L. decemlineata* la interacción de la toxina Cry3Aa con la metaloproteasa ADAM, a través de la región representada por el péptido pep-rec, podría facilitar la inserción de la toxina en la membrana del epitelio intestinal y la formación de poros. No obstante, dicha interacción también produciría la proteólisis de la toxina Cry3Aa, por lo que el resultado final de la toxicidad de Cry3Aa en *L. decemlineata* podría estar condicionado por la competencia entre estos dos procesos.

Frente al papel meramente degradador de la proteólisis que podría deducirse de los ensayos de formación de poro *in vitro*, otras evidencias demuestran que la proteólisis de la toxina Cry3Aa por una actividad metaloproteasa de tipo ADAM asociada al epitelio intestinal de *L. decemlineata* es clave para la toxicidad contra el insecto, sugiriendo que junto con la formación de poro, hay otros mecanismos implicados en la toxicidad.

La importancia del procesado proteolítico de la toxina Cry3Aa por la metaloproteasa ADAM en la toxicidad producida en *L. decemlineata* la comprobamos *in vivo*, utilizando larvas del insecto. La disminución de la toxicidad de Cry3Aa en larvas tratadas con la toxina en presencia de compuestos que previamente habíamos comprobado que inhiben su proteólisis, corrobora que el procesado proteolítico de la toxina Cry3Aa es clave en su toxicidad contra el escarabajo de la patata. Así, la disminución en la toxicidad de Cry3Aa en larvas en presencia del péptido pep-99 (Tabla 8), competidor por los sitios por los que es proteolizada la toxina, confirma la relevancia de la proteólisis de Cry3Aa por la metaloproteasa ADAM, en la toxicidad contra *L. decemlineata*. No obstante, es necesario resaltar que pep-99 compite por los sitios por los que se procesa la toxina por las proteasas asociadas a las BBMV para las que es sustrato, entre las que se encuentran la metaloproteasa ADAM, que es una proteína integral de membrana y cisteín proteasas de la familia de las intestinaínas. Estas últimas, aunque son proteínas solubles con función principalmente digestiva, las hemos encontrado asociadas a la membrana del epitelio intestinal, por lo que no podemos descartar que la proteólisis por cisteín proteasas también pueda ser importante para la toxicidad.

El tratamiento con la toxina Cry3Aa de MECs de *L. decemlineata*, previamente incubadas con el compuesto TFP, estimulador de la actividad proteolítica de metaloproteasas ADAM, produce un aumento en la toxicidad generada por Cry3Aa en las células, en comparación con la toxicidad producida por Cry3Aa en MECs que no habían sido tratadas con dicho compuesto (Tabla 6). El aumento de la toxicidad de Cry3Aa en presencia de TFP se correlaciona con el aumento de la proteólisis de la toxina catalizada por las BBMV también en su presencia (Figura 22A). Considerando que el compuesto TFP es un inhibidor de calmodulina y que

hemos comprobado que la toxina Cry3Aa se une a esta proteína (Figura 24), es posible postular que la estimulación de la proteólisis de Cry3Aa en presencia de TFP se debe a que dicho compuesto interfiere en la interacción entre Cry3Aa y calmodulina, lo cual aumenta la disponibilidad de la toxina para que pueda ser proteolizada por la metaloproteasa ADAM.

En 1997 Monette *et al.* describieron un aumento en la toxicidad provocada por la toxina Cry1C en células Sf9 de *Spodoptera frugiperda* en presencia de TFP, el cual se relacionó con el aumento de la concentración intracelular de calcio. Estos autores concluyen que Cry1C influye profundamente en los procesos intracelulares implicados en la homeostasis de calcio de las células Sf9, pero reconocen que queda por esclarecer si esos procesos celulares son dianas directas de la toxina o si se ven afectados por mensajeros intracelulares como resultado de la permeabilización de la membrana mediada por la toxina (Monette *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que Cry3Aa interacciona con calmodulina y que el aumento en la toxicidad de Cry3Aa en MECs de *L. decemlineata* en presencia de TFP está asociado a la estimulación producida por dicho compuesto en la proteólisis de la toxina Cry3Aa catalizada por una metaloproteasa ADAM.

La interacción de Cry3Aa con calmodulina podría afectar a varios mecanismos dependientes de calcio-calmodulina, incluyendo actividades calcio-ATPasa y quinasa y fosforilación y desfosforilación de proteínas, todas ellas críticas en el mantenimiento de la función celular.

Por otra parte, la influencia del procesado proteolítico de Cry3Aa por la metaloproteasa ADAM en la toxicidad podría estar relacionada con la generación de un fragmento de toxina con mayor capacidad citotóxica, o bien con que la estimulación de la actividad proteolítica de la metaloproteasa ADAM sobre un sustrato exógeno, como la toxina Cry3Aa, interfiriese en alguna función específica de la metaloproteasa en las células del epitelio intestinal. La toxicidad producida por el péptido pep-rec en MECs de *L. decemlineata* apoya la existencia de mecanismos de toxicidad alternativos a la formación de poro mediados por metaloproteasas ADAM.

De acuerdo con los resultados anteriormente discutidos, la citotoxicidad de Cry3Aa en MECs previamente tratadas con el compuesto extractor de colesterol MCD, el cual inhibe la proteólisis de Cry3Aa catalizada por las BBMV (Figura 22B), es menor que la toxicidad generada por Cry3Aa en células que no habían recibido dicho tratamiento (Tabla 7). La correspondencia entre la inhibición de la proteólisis de Cry3Aa y la disminución de la citotoxicidad generada en las MECs en presencia de MCD, nuevamente evidencia que el procesado proteolítico de la toxina Cry3Aa es importante para su toxicidad.

La disminución de la toxicidad de Cry3Aa en células tratadas con un extractor de colesterol confirma la importancia de la integridad de las regiones de la membrana plasmática enriquecidas en colesterol, como los *lipid rafts*, y evidencia la relevancia para la toxicidad de la interacción de Cry3Aa con dichas regiones. La alteración de la integridad de los *lipid rafts* podría impedir la unión de Cry3Aa a proteínas como las prohibitinas, que podrían estar directamente implicadas en la toxicidad, así como también a RACK1 y anexina, con cuya interacción se podría favorecer la posterior unión a otras proteínas, como la metaloproteasa ADAM en la región de la membrana *non-rafts*.

Algunos estudios han mostrado que determinados factores de virulencia de patógenos bacterianos activan la proteólisis catalizada por metaloproteasas de la familia de las ADAM de fragmentos extracelulares de proteínas de membrana en las células hospedadoras, y han sugerido que dicha activación puede estar implicada en la patogenicidad. Tal es el caso del ácido lipoteitoico, que es un factor de virulencia liberado de la pared celular de *S. aureus*, el cual activa la proteólisis mediada por ADAM10 del dominio extracelular de la proteína HB-EGF en células epiteliales, contribuyendo a promover la patogénesis de la bacteria (Lemjabbar y Basbaum, 2002). Asimismo, Park *et al.* (2001) han descrito que el factor de virulencia LasA de *Pseudomonas aeruginosa* activa la proteólisis del dominio extracelular de Syndecan-1 de la membrana de células epiteliales, el fragmento de Syndecan-1 liberado se une a varios factores de defensa del huésped, inhibiéndolos y contribuyendo a aumentar la patogenicidad de la bacteria. Otros factores de virulencia, como las toxinas- α y - β de *S. aureus*, también activan la proteólisis del fragmento extracelular de Syndecan-1 mediante un mecanismo en el que están

implicadas metaloproteasas de la familia de las ADAM de la célula hospedadora (Park *et al.*, 2004). De manera similar, en el modo de acción de la toxina Cry3Aa en *L. decemlineata*, la proteólisis de la toxina Cry3Aa, insertada o unida a la membrana, por una metaloproteasa de la familia de las ADAM presente en el epitelio intestinal podría originar fragmentos de Cry3Aa que interactuasen con moléculas involucradas en mecanismos de defensa del insecto, inhibiéndolos y contribuyendo a su toxicidad en el escarabajo de la patata.

5- Modelo de mecanismo de toxicidad

Durante la realización de este trabajo hemos comprobado que la interacción de la toxina Cry3Aa con la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata* es un proceso complejo que implica la unión de la toxina Cry3Aa a varias proteínas y su interacción con cisteín proteasas y metaloproteasas, probablemente de la familia de las ADAM, asociadas a dicha membrana. La proteólisis de la toxina catalizada por estas proteasas disminuye la capacidad de la toxina para formar poros *in vitro*, a la vez que aumenta la toxicidad de Cry3Aa en células disociadas del epitelio intestinal y en larvas de *L. decemlineata*, sugiriendo que la formación de poros no es el único mecanismo a través del cual Cry3Aa ejerce su acción tóxica en *L. decemlineata*. Hemos obtenido numerosas evidencias experimentales que indican que podrían existir mecanismos adicionales en el modo de acción de la toxina Cry3Aa en el escarabajo de la patata, en los que esté implicada la interacción de Cry3Aa con una metaloproteasa de la familia de las ADAM y también con proteínas localizadas en regiones de la membrana enriquecidas en colesterol como los *lipid rafts*. Esta propuesta podría encuadrarse dentro de un mecanismo de acción general de toxinas bacterianas, ya que recientemente se ha descrito que la toxina Hla producida por la bacteria *S. aureus* interactúa con la metaloproteasa ADAM10 y que tanto la unión de la toxina a células eucariotas como la citotoxicidad generada, requieren la presencia de la metaloproteasa, llegándose a proponer que la metaloproteasa ADAM10 podría ser un receptor de elevada afinidad para la toxina Hla de *S. aureus* (Wilke y Bubeck Wardenburg, 2010).

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten proponer un modelo que podría explicar algunas de las etapas del mecanismo a través del cual la toxina Cry3Aa ejerce su acción tóxica en *L. decemlineata*. Según este modelo (Figura 1), en una primera etapa la toxina Cry3Aa (A) podría interactuar con algún componente de los *lipid rafts* de la membrana del epitelio intestinal. Este componente, tal y como lo sugiere la identificación de varias proteínas de la fracción insoluble de las MECs en la que se inmunodetectó la unión de Cry3Aa (Figura 28, carrera I; Tabla 5), podría ser un complejo formado por las proteínas prohibitina-1 y -2, anexina y RACK1 (B), que funcionase como plataforma de concentración de la toxina en la membrana (1). La interacción de Cry3Aa con las prohibitinas, además, podría desencadenar alguna ruta de señalización celular o interferir en alguna ruta existente, generando toxicidad (1.1). La unión de la toxina a RACK1 podría mediar la posterior interacción con la metaloproteasa ADAM (C), localizada en la vecindad de los *lipid rafts*, interacción que también podría favorecerse por la desestabilización del citoesqueleto de actina, mediada por la unión de Cry3Aa a anexina (1.2).

La interacción de la toxina Cry3Aa con la metaloproteasa ADAM (2) podría desencadenar alguna ruta de señalización celular que estuviese implicada en la toxicidad (2.1) y también facilitar la inserción en la membrana de la toxina (3), con la consiguiente formación de poros (4). Una vez insertada, la toxina podría interactuar con proteínas localizadas en la región citoplasmática de la membrana: con V-ATPasa (D), produciendo la desestabilización de balances iónicos y de pH (3.1), lo cual podría contribuir a la toxicidad; y también con un complejo formado por actina (E) y calmodulina (F), localizado en las proximidades de la región intracelular de la membrana. La interacción con actina y calmodulina podría provocar alteraciones en el citoesqueleto de actina (3.2) y en cascadas de señalización celular dependientes de calcio-calmodulina (3.3), que podrían estar implicadas en la toxicidad.

La proteólisis catalizada por la metaloproteasa ADAM de la toxina insertada, regulada por la proteína calmodulina, a la vez que produciría la desestabilización de la estructura de los poros, provocaría que se liberasen fragmentos solubles de

toxina que podrían ser tóxicos *per se* o que podrían bloquear componentes de los sistemas de defensa del insecto aumentando la virulencia de la toxina Cry3Aa (5).

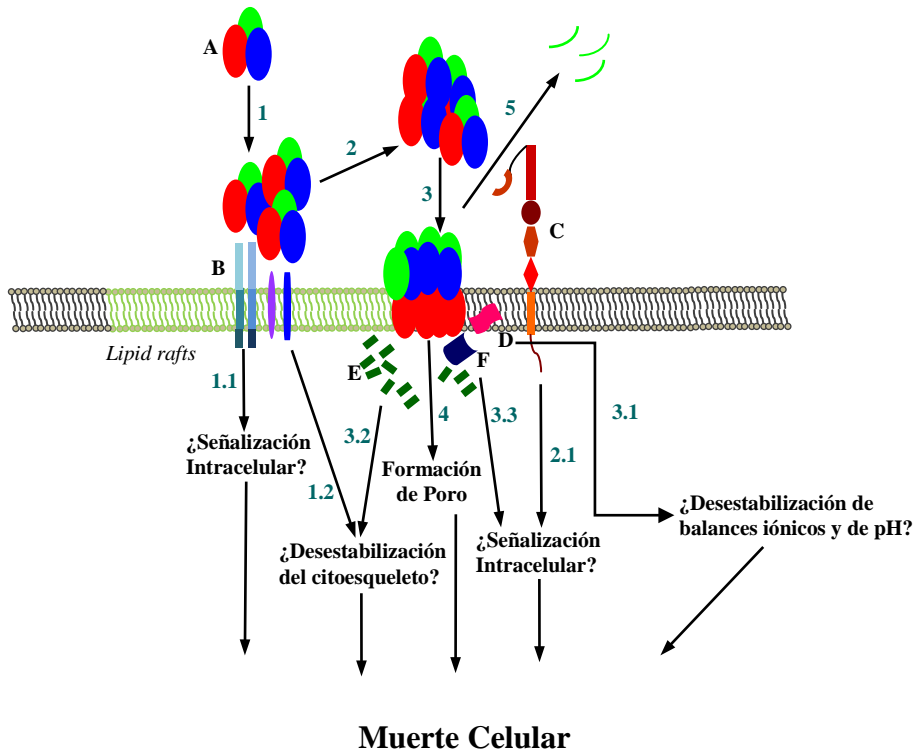


Figura 1.- Modelo hipotético que muestra algunas de las etapas del modo de acción de la toxina Cry3Aa en *L. decemlineata*. La interacción de la toxina Cry3Aa (A) con un complejo localizado en los *lipid rafts*, formado por las proteínas prohibitinas-1 y -2, anexina y RACK1 (B) aumenta la localización y concentración de la toxina en la vecindad de las microvellosidades intestinales (1), desencadena rutas de señalización celular (1.1) y provoca alteraciones en el citoesqueleto de actina (1.2), todo lo cual influye en la toxicidad. La unión de Cry3Aa a RACK1 facilita la interacción de Cry3Aa con la metaloproteasa ADAM (C) en la proximidad de los *lipid rafts* (2), desencadenando rutas de señalización celular implicadas en la toxicidad (2.1) y posibilitando la inserción de la toxina en la membrana (3) y la formación de poros (4). Una vez insertada, la toxina interactúa con la proteína V-ATPasa (D), provocando la desestabilización de balances iónicos y de pH (3.1), y con un complejo formado por actina (E) y calmodulina (F), contribuyendo a la desestabilización del citoesqueleto (3.2) e interfiriendo en cascadas de señalización celular dependientes de calcio-calmodulina (3.3). La proteólisis de Cry3Aa catalizada por la metaloproteasa ADAM genera fragmentos solubles de toxina que bloquean componentes de los sistemas de defensa del insecto que contribuyen a aumentar la patogenicidad (5).

Conclusiones

Conclusiones

A continuación se incluyen las conclusiones principales que pueden extraerse del presente trabajo, acompañadas de un breve resumen de las evidencias que las sustentan.

1- La toxina Cry3Aa se proteoliza por proteasas asociadas a BBMV de *L. decemlineata*. La proteólisis tiene lugar por regiones expuestas del dominio III de Cry3Aa y es catalizada por metaloproteasas, probablemente de la familia de las ADAM, y cisteín proteasas de la familia de las intestaínas. El reconocimiento de la toxina Cry3Aa por la metaloproteasa ADAM debe producirse a través de una secuencia localizada en el lazo 1 del dominio II que contiene una secuencia consenso de sustratos de ADAM10. El análisis de la influencia de moduladores de la actividad proteolítica de metaloproteasas ADAM en la proteólisis de la toxina Cry3Aa catalizada por las BBMV pone de manifiesto que el compuesto extractor de colesterol MCD disminuye la proteólisis de la toxina y el inhibidor de calmodulina TFP produce su incremento. La unión de la proteína calmodulina a Cry3Aa impide la proteólisis de la toxina catalizada por la metaloproteasa ADAM.

2- La toxina Cry3Aa interactúa en la membrana del epitelio intestinal de *L. decemlineata* con proteínas localizadas tanto en los *lipid rafts* como fuera de estos microdominios. La actividad metaloproteasa que proteoliza Cry3Aa se localiza en la fracción soluble o región *non-rafts* de la membrana de células disociadas del epitelio intestinal de *L. decemlineata*. Entre las proteínas que interactúan con Cry3Aa hemos identificado, por homología de secuencia, las proteínas prohibitina-1 y -2, RACK1, anexina, actina, 14-3-3 y V-ATPasa,

proteínas cuya interacción con Cry3Aa no había sido descrita, ni se habían previamente identificado en *L. decemlineata*.

3- La interacción de la toxina Cry3Aa con la metaloproteasa ADAM asociada al epitelio intestinal es un evento clave en su modo de acción y en la toxicidad generada en *L. decemlineata*. El péptido pep-rec, cuya estructura representa la secuencia de reconocimiento de la toxina Cry3Aa por la metaloproteasa ADAM, produce un efecto tóxico específico en células disociadas del epitelio intestinal de *L. decemlineata*. El procesado proteolítico de la toxina Cry3Aa catalizado por la metaloproteasa ADAM es necesario para su toxicidad en células disociadas del epitelio intestinal y en larvas de *L. decemlineata*.

Bibliografía

Bibliografía

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

Agrawal, N., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K. 2002. Interaction of gene-cloned and insect cell-expressed aminopeptidase N of *Spodoptera litura* with insecticidal crystal protein Cry1C. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4583-4592.

Allinson, T.M., Parkin, E.T, Condon, T.P, Schwager, S.L., Sturrock, E.D., Turner, A.J., Hooper, N.M. 2004. The role of ADAM10 and ADAM17 in the ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein. *Eur. J. Biochem.* 271(12): 2539-2547.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids. Res.* 25(17): 3389-3402.

Alyokhin, A. 2009. Colorado Potato Beetle Management on Potatoes: Current Challenges and Future Prospects. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* 3: 10-19.

Amour, A., Knight, C.G., Webster, A., Slocombe, P.M., Stephens, P.E., Knäuper, V., Docherty, A.J., Murphy, G. 2000. The *in vitro* activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett.* 473(3): 275-279.

Ande, S.R., Mishra, S. 2010. Palmitoylation of prohibitin at cysteine 69 facilitates its membrane translocation and interaction with Eps 15 homology domain protein 2 (EHD2). *Biochem. Cell. Biol.* 88(3): 553-558.

- Arenas, I., Bravo, A., Soberón, M., Gómez, I.** 2010. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Biol Chem.* 2010. 285(17): 12497-12503.
- Babiychuk, E.B., Draeger, A.** 2000. Annexins in cell membrane dynamics. Ca (2+)-regulated association of lipid microdomains. *J. Cell. Biol.* 150(5): 1113-1124.
- Bacher, S., Achatz, G., Schmitz, M.L, Lamers, M.C.** 2002. Prohibitin and prohibitone are contained in high-molecular weight complexes and interact with alpha-actinin and annexin A2. *Biochimie.* 84(12): 1207-1220.
- Balachowsky, A. S.** 1963. Entomologie appliquée à l'agriculture. Tome I. Coléoptères. 2^o Volume. Ed. Masson et Cie. Paris. 1391 pp.
- Banks, D. J., Hua, G., Adang, M. J.** 2003. Cloning of a *Heliothis virescens* 110 kDa aminopeptidase N and expression in *Drosophila* S2 cells. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 499-508.
- Barrett, A.J., Kirschke, H.** 1981. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. *Methods. Enzymol.* 80:535-561.
- Bayyareddy, K., Andacht, T.M., Abdullah, M.A., Adang, M.J.** 2009. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 39(4): 279-286.
- Beyenbach, K.W., Wiczorek, H.** 2006. The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J. Exp. Biol.* 209 (4): 577-589.
- Birk, Y., Applebaum, S.W.** 1960. Effect of soybean trypsin inhibitors on the development and midgut proteolytic activity of *Tribolium castaneum* larvae. *Enzymologia* 22: 318-326.
- Bolter, C.J., Jongma, M.A.** 1995. Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. *Insect Physiol.* 41:1071-1078.
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D.J., Li, J.** 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* 348: 363-382.
- Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, Ch., Lescar, J.** 2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8 Angstrom resolution. *J. Bacteriol.* 188: 3391-3401.

- Borisova, S., Crochulki, P., Van Faassen, H., Pusztai-Carey, M., Masson, L., Cygler, M.** 1994. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the lepidopteran-specific insecticidal crystal protein CryIA(a). *J. Mol. Biol.* 243: 530-532.
- Bourd-Boittin, K., Le Pabic, H., Bonnier, D., L'Helgoualc'h, A., Théret, N.** 2008. RACK1, a new ADAM12 interacting protein. Contribution to liver fibrogenesis. *J. Biol. Chem.* 283(38): 26000-26009.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the cuantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brasaemle, D.L., Dolios, G., Shapiro, L., Wang, R.** 2004. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 279(45): 46835-46842.
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S.S., Soberón, M.** 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* CryIAb pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta* 1667(1): 38-46.
- Brovosky, D.** 1986. Proteolytic enzymes and blood digestion in the mosquito *Culex nigripalpus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 3: 147-160.
- Brown, D.A.** 2006. Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology* (Bethesda). 21: 430-439.
- Brown, D.A., Rose, J.K.** 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.* 68: 533-544.
- Brown, J.W., McKnight, C.J.** 2010. Molecular model of the microvillar cytoskeleton and organization of the brush border. *PLoS One.* 5(2): e9406.
- Burton, S.L., Ellar, D.J., Li, J., Derbyshire, D.J.** 1999. N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J. Mol. Biol.* 287: 1011-1022.
- Candas, M., Loseva, O., Oppert, B., Kosaraju, P., Bulla, L.A. Jr.** 2003. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: alterations in the Indian meal moth larval gut proteome. *Mol. Cell. Proteomics.* 2(1): 19-28.

- Carroll, J., Convents, D., Van Damme, J., Boets, A., Van Rie, J., Ellar, D.J.** 1997. Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A δ -endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. *J. Invertebr. Pathol.* 70: 41-49.
- Carroll, J., Li, J., Ellar, D.J.** 1989. Proteolytic processing of a coleopteran specific δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Biochem. J.* 261:99-105.
- Casagrande, R. A.** 1987. The Colorado potato beetle: 125 years of mismanagement. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 33: 142-150.
- Chen, L.Z., Liang, G.M., Zhang, J., Wu, K.M., Guo, Y.Y., Rector, B.G.** 2009. Proteomic analysis of novel Cry1Ac binding proteins in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 73(2): 61-73.
- Christeller, J.T., Shaw, B.D., Gardiner, S.E., Dymock, J.** 1989. Partial purification and characterization of the major midgut proteases of grass grub larvae (*Costelytra zealandica*, Coleoptera: Scarabaeidae). *Insect Biochem.* 19: 221-231.
- Chungjatupornchai, W., Höfte, H., Seurinck, J., Angsuthanasombat, C., Vaeck, M.** 1988. Common features of *Bacillus thuringiensis* toxins specific for Diptera and Lepidoptera. *Eur. J. Biochem.* 173: 9-16.
- Colepicolo-Neto, P., Bechara, E. J. H., Ferreira, C., Terra, W. R.** 1987. Digestive enzymes in close and distant genera of a same family: properties of midgut hydrolases from luminescent *Pyrophorus divergens* (Coleoptera: Elateridae) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 87: 755-759.
- Corsini, E., Racchi, M., Sinforiani, E., Lucchi, L., Viviani, B., Rovati, G.E., Govoni, S., Galli, C.L., Marinovich, M.** 2005. Age-related decline in RACK-1 expression in human leukocytes is correlated to plasma levels of dehydroepiandrosterone. *J. Leukoc. Biol.* 77(2): 247-256.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Dean D.H.** 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 807-813.
- Cristofolletti, P.T., Terra, W.R.** 2000. The role of amino acid residues in the active site of a midgut microvillar aminopeptidase from the beetle *Tenebrio molitor*. *Biochim Biophys Acta.* 1479(1-2): 185-195.

- Dai, S.M., Gill, S.S.** 1993. *In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23(2): 273-283.
- de Maag, R.A., Kwa, M.S.G., Van der Klei, H., Yamamoto, T., Schipper, B., Vlak, J.M., Stiekema, W.J., Bosh, D.** 1996. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1537-1543.
- de Maagd, R.A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., Schnepf, H.E.** 2003 Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 37: 409-433.
- Díaz-Rodríguez, E., Esparís-Ogando, A., Montero, J.C., Yuste, L., Pandiella, A.** 2000. Stimulation of cleavage of membrane proteins by calmodulin inhibitors. *Biochem. J.* 346 (2): 359-367.
- Donovan, W.P., Rugar, M.J., Slaney, K.A.C., Malvar, T., Gowran-Burke, M.C., Johnson, T.B.C.** 1992. Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to coleopteran species. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3921-3927.
- Dow, J.A.T.** 1986. Insect midgut function. *Adv. Insect Physiol.* 19: 187-238.
- Edwards, D.R., Handsley, M.M., Pennington, C.J.** 2008. The ADAM metalloproteinases. *Mol. Aspects. Med.* 29(5): 258-289.
- Eguchi, M., Iwamoto, A.** 1982. Comparison of three alkaline proteases from digestive fluid of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 71(4): 663-668.
- Emerson, V., Holtkotte, D., Pfeiffer, T., Wang, I.H., Schnölzer, M., Kempf, T., Bosch, V.** 2010. Identification of the cellular prohibitin 1/prohibitin 2 heterodimer as an interaction partner of the C-terminal cytoplasmic domain of the HIV-1 glycoprotein. *J. Virol.* 84(3): 1355-1365.
- Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A., Koziel, M.G.** 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93(11): 5389-5394.
- Fabrick, J., Oppert, C., Lorenzen, M.D., Morris, K., Oppert, B., Jurat-Fuentes, J.L.** 2009. A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. *J. Biol. Chem.* 284(27):18401-18410.

- Feitelson, J.S., Payne, J., Kim, L.** 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology*. 10:271-275.
- Feldman, J., Stone, T.** 1997. The development of a comprehensive resistance management plan for potatoes expressing the Cry3A endotoxin. En: Carozzi, N., Koziel, M. (Eds.) *Advances in insect control; the role of transgenic plants*. Taylor & Francis Ltd. London: 49-61.
- Fernández, L.E., Aimanova, K.G., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M.** 2006. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem. J.* 394: 77-84.
- Ferré, J., Van Rie, J.** 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47:501-533.
- Ferro, D.N.** 1985. Pest status and control strategies of the Colorado potato beetle. En Ferro, D.N. y R. Hurley (Eds.). *Proceedings of the Symposium on the Colorado Potato Beetle, XVII Int. Congr. Entomol. Massachusetts Exp. Stat. Res. Bull.* 704:1-8.
- Ferro, D.N.** 1994. Biological control of the Colorado potato beetle. En: Zehnder, G.W., Jansson, R.K., Powelson, M.L., Raman, K.V. (Eds) *Advances in Potato Pest Biology and Management*, APS Press, St Paul: 357-375.
- Flannagan, R.D., Yu, C.G., Mathis, J.P., Meyer, T.E., Shi, X., Siqueira, H.A., Siegfried, B.D.** 2005. Identification, cloning and expression of a Cry1Ab cadherin receptor from European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 33-40.
- Forcada, C., Alcácer, E., Garcerá, M.D., Tato, A., Martínez, R.** 1996. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: proteolytic and SEM study of the larval midgut. *Arch Insect Biochem Physiol.* 42(1): 51-63.
- Forgash, A.J.** 1987. Insecticide resistance in the Colorado potato beetle. En: Ferro, D.N. y R. Hurley (Eds.). *Proceedings of the Symposium on the Colorado Potato Beetle, XVII Int. Congr. Entomol. Massachusetts Exp. Stat. Res. Bull.* 704: 33-52.
- Foster, L.J., De Hoog, C.L., Mann, M.** 2003. Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100(10): 5813-5818.

- Gahan, L. J., Gould, F., Heckel, D.G.** 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*. 293: 857-860.
- Galitsky, N., Cody, V., Wojtezak, A., Ghosh, D., Luft, J.R., Pangborn, W., English, L.** 2001. Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr. D. Biol.* 57 (8): 1101-1109.
- Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J.F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C., Desjardins, M.** 2001. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J. Cell. Biol.* 152(1): 165-180.
- Garner, K.J., Hiremath, S., Lehtoma, K., 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. Biochem. Mol. Biol.* 29: 527-535.
- Gauthier, N.L., Hofmaster, R.N., Semel, N.** 1981. History of Colorado potato beetle control En: Lashomb J.H., Casagrande, R. (Eds) *Advances in Potato Pest Management*, *Hutchinson Ross Publishing Co., Stroudsburg, PA*, 13-33.
- Gerke, V., Moss, S.E.** 2002. Annexins: From Structure to Function. *Physiol. Rev.* 82: 331-371.
- Gil, C., Cubí, R., Aguilera, J.** 2007. Shedding of the p75NTR neurotrophin receptor is modulated by lipid rafts. *FEBS Lett.* 581(9): 1851-1858.
- Gill, S.S., Cowles, E.A., Francis, V.** 1995. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAC toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* 270: 27277-27282.
- Gödde, N.J., D'Abaco, G.M., Paradiso, L., Novak, U.** 2006. Efficient ADAM22 surface expression is mediated by phosphorylation-dependent interaction with 14-3-3 protein family members. *J. Cell. Sci.* 119(16): 3296-3305.
- Gómez, I., Pardo-López, L., Muñoz-Garay, C., Fernández, L.E., Pérez, C., Sánchez, J., Soberón, M., Bravo, A.** 2007. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* 28(1):169-173.
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., 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.

- Gomis-Rüth, F.X.** 2003. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol. Biotech.* 24: 157-202.
- Gomis-Rüth, F.X.** 2009. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *J. Biol. Chem.* 284: 15353-15357.
- Goulet, M.C., Dallaire, C., Vaillancourt, L.P., Khalf, M., Badri, A.M., Preradov, A., Duceppe, M.O., Goulet, C., Cloutier, C., Michaud, D.** 2008. Tailoring the specificity of a plant cystatin toward herbivorous insect digestive cysteine proteases by single mutations at positively selected amino acid sites. *Plant. Physiol.* 146(3): 1010-1009.
- Grafius, E.J., Douches, S.** 2008. The present and future role of insect-resistant genetically modified potato cultivars in potato IPM. En: Romeis, J., Shelton, A.M., Kennedy, G.G. (Eds). *Integration of Insect-Resistant GM Crops Within IPM Program*, Springer, New York: 195-222.
- Griffitts, J.S., Haslam, S.M., Yang, T., Garczynski, S.F., Mulloy, B., Morris, H., Cremer, P.S., Dell, A., Adang, M.J., Aroian, R.V.** 2005. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science.* 307: 922-925.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.L., Brosseau, R., Cygler, M.** 1995. *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254: 447-464.
- Gruden, K., Kuipers, A.G., Guncar, G., Slapar, N., Strukelj, B., Jongsma, M.A.** 2004. Molecular basis of Colorado potato beetle adaptation to potato plant defence at the level of digestive cysteine proteinases. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 34(4): 365-375.
- Gruden, K., Popovic, T., Cimerman, N., Krizaj, I., Strukelj, B.** 2003. Diverse enzymatic specificities of digestive proteases, 'intestains', enable Colorado potato beetle larvae to counteract the potato defence mechanism. *Biol. Chem.* 384(2): 305-310.
- Grundy, W.N., Bailey, T.L., Elkan, C.P.** 1996. MEME: a parallel implementation and a web interface for a DNA and protein motif discovery tool. *Comput. Appl. Biosci.* 12: 303-310.
- Guerchicoff, A., Ugalde, R.A., Rubinstein, C.P.** 1997. Identification and characterization of a previously undescribed cyt gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl Environ Microbiol.* 63(7): 2716-2721.

- Haffani, Y.Z., Cloutier, C., Bezile, F.J.** 1996. *Bacillus thuringiensis* Cry3Ca1 protein is toxic to the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Biotechnol. Prog.* 17: 211-216.
- Hahm, B., Han, D.S., Back, S.H., Song, O.K., Cho, M.J., Kim, C.J., Shimotohno, K., Jang, S.K.** 1995. NS3-4A of hepatitis C virus is a chymotrypsin-like protease. *J. Virol.* 69(4): 2534-2539.
- Harcourt, D.G.** 1971. Population dynamics of *Leptinotarsa decemlineata* (Say) in eastern Ontario. III. Major population processes. *Canadian Entomologist* 103: 1049-1061.
- Hattori, M., Osterfield, M., Flanagan, J.G.** 2000. Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science.* 289: 1360-1365.
- Heimpel, A.M., Angus, T.A.** 1959. The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. *J. Insect. Pathol.* 1: 152-170.
- Hernández, C. A., Pujol, M., Alfonso-Rubí, J., Armas, R., Coll, Y., Pérez, M., González, A., Ruiz, M., Castañeira, P., Ortego, F.** 2003. Proteolytic gut activities in the rice water weevil, *Lissorhoptrus brevisrostris Suffrian* (Coleoptera: Curculionidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 53: 19-29.
- Hernstadt, C., Gilroy, T.E., Solesk, D.A., Bennet, B.D., Gautner, F.H.** 1987. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a coleopteran active δ -endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *san diego*. *Gene.* 57: 81-116.
- Hernstadt, C., Soares, G.C., Wilcox, E.R., Edwards, D.L.** 1986. A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran insects. *Bio/Technology.* 4: 305-308.
- Herrero, S., Gechev, T., Bakker, P. L., Moar, W.J., de Maagd, R.A.** 2005. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four aminopeptidase N genes. *BMC Genomics.* 6: 96.
- Herreros, J., Ng, T., Schiavo, G.** 2001. Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol. Biol. Cell.* 12: 2947-2960.
- Höfte, H., Seurinck, J., Van Houtven, A., Vaeck, M.** 1987. Nucleotide sequence of a gene encoding an insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* toxic against Coleoptera. *Nucleic Acids Res.* 15(17): 71-83.
- Hooper, N.M.** 1994. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* 354:1-6.

- Hua, G., Zhang, R., Abdullah, M.A., Adang, M.J.** 2008. *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. *Biochemistry*. 47: 5101-5110.
- Huovila, A.P., Turner, A.J., Pelto-Huikko, M., Kärkkäinen, I., Ortiz, R.M.** 2005. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem. Sci.* 7: 413-422.
- Jacques, R. L. Jr.** 1988. The potato beetles. The genus *Leptinotarsa* in North America (Coleoptera: Chrysomelidae). *Flora & fauna handbook*. No. 3. E. J. Brill. NewYork.
- Jain, R., Ghoshal, A., Mandal, C., Shaha, C.** 2010. *Leishmania* cell surface prohibitin: role in host-parasite interaction. *Cell. Microbiol.* 12(4): 432-452.
- Jenkins, J.L., Dean, D.H.** 2000. Exploring the mechanism of action of insecticidal proteins by genetic engineering methods. *Genet. Eng.* 22: 33-54.
- Jurat-Fuentes, J. L., Adang, M.J.** 2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J. Biochem.* 271: 3127-3135.
- Jurat-Fuentes, J.L., Adang, M.J.** 2006. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 92(3): 166-171.
- Kahn, J., Walcheck, B., Migaki, G.I., Jutila, M.A., Kishimoto, T.K.** 1998. Calmodulin regulates L-selectin adhesion molecule expression and function through a protease-dependent mechanism. *Cell.* 92(6): 809-818.
- Kalus, I., Bormann, U., Mzoughi, M., Schachner, M., Kleene, R.** 2006. Proteolytic cleavage of the neural cell adhesion molecule by ADAM17/TACE is involved in neurite outgrowth. *J. Neurochem.* 98(1): 78-88.
- Kalus, I., Schnegelsberg, B., Seidah, N.G., Kleene, R., Schachner, M.** 2003. The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1. *J. Biol. Chem.* 278(12): 10381-10388.
- Knight, P.J., Carroll, J., Ellar, D.J.** 2004. Analysis of glycan structures on the 120 kDa aminopeptidase N of *Manduca sexta* and their interactions with *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 101-112.
- Knight, P.J., Knowles, B.H., Ellar, D.J.** 1995. Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin. *J. Biol. Chem.* 270: 17765-17770.

- Knowles, B.H., Dow, J.A.** 1993. The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action in the insect gut. *Bioessays* 15: 469-475.
- Knowles, B.H.** 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins. En: *Advances in Insect Physiology*. (Ed. PD Evans). Academic Press, London. 24: 275-308.
- Knowles, B.H., Ellar, D.J.** 1987. Colloid osmotic lysis is a general feature of mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin with different insect specificity. *Biochem. Biophys. Acta*. 924: 509-518.
- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W., Fahrenholz, F.** 2001. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 98(10): 5815-5820.
- Koller, C.N., Bauer, L.S., Hollingworth, R.M.** 1992. Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* native delta-endotoxin crystals. *Biochem Biophys Res Commun*. 184: 692-699.
- Kolonin, M.G., Saha, P.K., Chan, L., Pasqualini, R., Arap, W.** 2004. Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. *Nat. Med.* 10(6): 625-632.
- Krieg, A., Huger, A.M., Langenbruch, G.A., Schenetter, W.** 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebriosis*: ein neuer, gegenüber Larven von Coleopteran wirksamer Pathothype. *Z. Angew. Entomol.* 96: 500-508.
- Krishnamoorthy, M., Jurat-Fuentes, J.L., McNall, R.J., Andacht, T., Adang, M.J.** 2007. Identification of novel Cry1Ac binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 37(3): 189-201.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lambert, B., Höfte, H., Annys, K., Jansens, S., Soetaert, P., Peferoen, M.** 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins with a silent activity against Coleopteran larvae. *Appl. Entomol. Microbiol.* 58: 2536-2542.
- Lambert, D.W., Clarke, N.E., Hooper, N.M., Turner, A.J.** 2008. Calmodulin interacts with angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) and inhibits shedding of its ectodomain. *FEBS Lett.* 582(2): 385-390.
- Lemjabbar, H., Basbaum, C.** 2002. Platelet-activating factor receptor and ADAM10 mediate responses to *Staphylococcus aureus* in epithelial cells. *Nat. Med.* 8(1): 41-46.

- Li, J., Carroll, J., Ellar, D.J.** 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*. 535: 815-821.
- Li, J., Derbyshire, D.J., Promdonky, B., Ellar, D.J.** 2001. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochem. Soc. Trans.* 29: 571-577.
- Llovera, M., de Pablo, Y., Egea, J., Encinas, M., Peiró, S., Martín-Zanca, D., Rocamora, N., Comella, J.X.** 2004. Trk is a calmodulin-binding protein: implications for receptor processing. *J. Neurochem.* 88(2): 422-433.
- Loseva, O., Ibrahim, M., Candas, M., Koller, C.N., Bauer, L.S., Bulla, L.A. Jr.** 2002. Changes in protease activity and Cry3Aa toxin binding in the Colorado potato beetle: implications for insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32(5): 567-577.
- Luo, K., Sangadala, S., Masson, L., Mazza, A., Brousseau, R., Adang, M.J.** 1997. The *Heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase functions as “receptor A” by mediating specific *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ -endotoxin binding and pore formation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27:735-743.
- Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., de Strooper, B., Hartmann, D., Saftig, P.** 2005. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102 (26): 9182-9187.
- Martin, M.M., Martin, J.S.** 1984. Surfactants: their role in preventing the precipitation of proteins by tannins in insect guts. *Oecologia*. 61: 265-275.
- Martínez-Ramírez, A.C., Real, M.D.** 1996. Proteolytic processing of *Bacillus thuringiensis* CryIIIa toxin and specific binding to brush-border membrane vesicles of *Leptinotarsa decemlineata* (Colorado potato beetle). *Pestic. Biochem. Physiol.* 54: 115-122.
- Martins, E.S., Monnerat, R.G., Queiroz, P.R., Dumas, V.F., Braz, S.V., de Souza Aguiar, R.W., Gomes, A.C., Sánchez, J., Bravo, A., Ribeiro, B.M.** 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. Biochem. Mol. Biol.* 40(2): 138-145.
- Matthews, V., Schuster, B., Schütze, S., Bussmeyer, I., Ludwig, A., Hundhausen, C., Sadowski, T., Saftig, P., Hartmann, D., Kallen, K.J., Rose-John, S.** 2003. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J. Biol. Chem.* 278(40): 38829-38839.

- McCahill, A., Warwicker, J., Bolger, G.B., Houslay, M.D., Yarwood, S.J.** 2002. The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms. *Mol. Pharmacol.* 62(6): 1261-1273.
- McNall, R.J., Adang, M.J.** 2003. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33(10): 999-1010.
- McPherson, S.A., Perlak, F.J., Fuchs, R.L., Marrone, P.G., Lavrik, P.B., Fischhoff, D.** 1988. Characterization of the coleopteran-specific protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Bio/Technology.* 6: 61-66.
- Menzies, B.E., Kourteva, I.** 2000. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in endothelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29: 39-45.
- Merlos-Suárez, A., Ruiz-Paz, S., Baselga, J., Arribas, J.** 2001. Metalloprotease-dependent protransforming growth factor-alpha ectodomain shedding in the absence of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 276(51): 48510-48517.
- Michaud, D., Nguyen-Quoc, B., Vrain, T.C., Fong, D., Yelle, S.** 1996. Response of digestive cysteine proteinases from the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) and the black vine weevil (*Otiorynchus sulcatus*) to a recombinant form of human stefin A. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 31(4): 451-464.
- Michaud, D., Nguyen-Quoc, B., Yelle, S.** 1993. Selective inhibition of Colorado potato beetle cathepsin H by oryza cystatins I and II. *FEBS Lett.* 331(1-2):173-176.
- Mishra, S., Ande, S.R., Nyomba, B.L.** 2010. The role of prohibitin in cell signaling. *FEBS J.* 277(19): 3937-3946.
- Monette, R., Potvin, L., Baines, D., Laprade, R., Schwartz, J.L.** 1997. Interaction between Calcium Ions and *Bacillus thuringiensis* Toxin Activity against Sf9 Cells (*Spodoptera frugiperda*, Lepidoptera). *Appl. Environ. Microbiol.* 63(2): 440-447.
- Mooseker, M.S.** 1985. Organization, chemistry, and assembly of the cytoskeletal apparatus of the intestinal brush border. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 1: 209-241.
- Morin, S., Biggs, R.W., Sisterson, M.S., Shriver, L., Ellers-Kirk, C., Higginson, D., Holley, D., Gahan, L.J., Heckel, D.G., Carriere, Y., Dennehy, T.J., Brown, J.K., Tabashnik, B.E.** 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100: 5004-5009.

- Morrow, I.C., Parton, R.G.** 2005. Flotillins and the PHB domain protein family: rafts, worms and anaesthetics. *Traffic*. 6(9): 725-740.
- Morse, R.J., Yamamoto, T., Stroud, R.M.** 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure*. 9:409-417.
- Murdock, L.L., Brookhart, G., Dunn, P.E., Foard, D.E., Kelley, S., Kitch, L., Shade, R.E., Shukle, R.H., Wolfson, J.L.** 1987. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B: 783-787.
- Nagamatsu, Y., Toda, S., Koike, T., Miyoshi, Y., Shigematsu, S., Kogure, M.** 1998a. Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 727-734.
- Nagamatsu, Y., Toda, S., Yamaguchi, F., Ogo, M., Kogure, M., Nakamura, M., Shibata, Y., Katsumoto T.** 1998. Identification of *Bombyx mori* midgut receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA (a) toxin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62:718-726.
- Nagano, O., Murakami, D., Hartmann, D., De Strooper, B., Saftig, P., Iwatsubo, T., Nakajima, M., Shinohara, M., Saya, H.** 2004. Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation. *J. Cell. Biol.* 165(6): 893-902.
- Nair, M.S., Dean, D.H.** 2008. All domains of Cry1A toxins insert into insect brush border membranes. *J. Biol. Chem.* 283(39): 26324-26331.
- Nakanishi, K., Yaoi, K., Nagino, Y., Hara, H., Kitami, M., Atsumi, S., Miura, N., 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 Lett.* 519: 215-220.
- Nelson, K.L., Brodsky, R.A., Buckley, J.T.** 1999. Channels formed by subnanomolar concentrations of the toxin aerolysin trigger apoptosis of T lymphomas. *Cell. Microbiol.* 1: 69-74.
- Novillo, C., Castanera, P., Ortego, F.** 1997. Characterisation and distribution of chymotrypsin and other digestive proteinases in Colorado potato beetle larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 36: 181-201.
- Oltean, D.I., Pullikuth, A.K., Lee, H. K., Gill, S.S.** 1999. Partial purification and characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin receptor A from *Heliothis virescens* and cloning of the corresponding cDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 11: 4760-4766.

- Oppert, B.** 1999. Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 42:1-12.
- Oppert, B., Hartzler, K., Zuercher, M.** 2002. Digestive proteinases in *Lasioderma serricornis* (Coleoptera: Anobiidae). *Bull Entomol. Res.* 92(4):331-336.
- Oppert, B., Kramer, K.J., Beeman, R.W., Johnson, D., McGaughey, W.H.** 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J Biol Chem.* 272(38): 23473-6.
- Osman, C., Merkwirth, C., Langer, T.** 2009. Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. *J. Cell. Sci.* 122 (21): 3823-3830.
- Pacheco, S., Gómez, I., Arenas, I., Saab-Rincon, G., Rodríguez-Almazán, C., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M.** 2009. Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a "ping pong" binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. *J. Biol. Chem.* 284(47): 32750-32757.
- Pacquelet, A., Lin, L., Rorth, P.** 2003. Binding site for p120/delta-catenin is not required for *Drosophila* E-cadherin function in vivo. *J. Cell. Biol.* 160(3): 313-319.
- Pan, D., Rubin, G.M.** 1997. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell.* 90 (2): 271-280.
- Pang, A.S, Gringorten, J.L, Bai, C.** 1999. Activation and fragmentation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by high concentrations of proteolytic enzymes. *Can. J. Microbiol.* 45(10): 816-825.
- Park, P.W., Foster, T.J., Nishi, E., Duncan, S.J., Klagsbrun, M., Chen, Y.** 2004. Activation of syndecan-1 ectodomain shedding by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin and beta-toxin. *J. Biol. Chem.* 279(1): 251-258.
- Park, P.W., Pier, G.B., Hinkes, M.T., Bernfield, M.** 2001. Exploitation of syndecan-1 shedding by *Pseudomonas aeruginosa* enhances virulence. *Nature.* 411(6833): 98-102.
- Park, Y., Abdullah, M. A., Taylor, M. D., Rahman, K., Adang, M. J.** 2009. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa y Cry3Bb toxicities to coleopteran larvae by a toxin-binding fragment of an insect cadherin. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (10): 3086-3092.

- Parr-Sturgess, C.A., Rushton, D.J., Parkin, E.T.** 2010. Ectodomain shedding of the Notch ligand Jagged1 is mediated by ADAM17, but is not a lipid-raft-associated event. *Biochem. J.* 432(2): 283-294.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E.** 2004. UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25: 1605-1612.
- Pigott, C.R., Ellar, D.J.** 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71: 255-281.
- Popova-Butler, A., Dean, D.H.** 2009. Proteomic analysis of the mosquito *Aedes aegypti* midgut brush border membrane vesicles. *J. Insect. Physiol.* 55(3): 264-272.
- Priest, F.G., Barker, M., Baillie, L.W., Holmes, E.C., Maiden, M.C.** 2004. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J. Bacteriol.* 186(23): 7959-7970.
- Purcell, J.P., Greenplate, J.T., Sammons, R.D.** 1992. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 22: 41-47.
- Quinton, R.J.** 1955. DDT-Resistant Colorado potato beetle?. *Proceedings of the North Central Entomological Society of America* 9: 94-95.
- Rajangopal, R., Agrawai, N., Seivapandiyan, A., Sivakumar, S., Ahmad, S., Bhatnagar, R. K.** 2003. Recombinantly expressed isozymic aminopeptidases from *Helicoverpa armigera* midgut display differential interaction with closely related Cry proteins. *Biochem. J.* 370: 971-978.
- Rausell, C., García-Robles, I., Sánchez, J., Muñoz-Garay, C., Martínez-Ramírez, A.C., Real, M.D., 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: 99-105.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J.** 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* 290: 205-218.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Bateman, A.** 2010. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 38: 227-233.
- Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D., Saftig, P.** 2005. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J.* 24 (4): 742-752.

- Reiss, K., Saftig, P.** 2009. The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin. Cell. Dev. Biol.* (2):126-137.
- Reuveni, M., Dunn, P.E.** 1991. Differential inhibition by *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin of leucine and aspartic acid uptake into BBMV from midgut of *Manduca sexta*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 1089-1093.
- Riley, C.V.** 1871. Third annual report on the noxious, beneficial, and other insects of the state of Missouri. Regan and Carter, Jefferson City, MO.
- Robertson, M.J., Cunoosamy, M.P., Clark, K.L.** 1992. Effects of peptidase inhibition on angiotensin receptor agonist and antagonist potency in rabbit isolated thoracic aorta. *Br. J. Pharmacol.* 106(1):166-72.
- Ron, D., Chen, C.H., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E., Mochly-Rosen, D.** 1994. Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91(3): 839-843.
- Salvesen, G.S., Nagase, H.** 2001. Inhibition of proteolytic enzymes. En: Proteolytic Enzymes: A Practical Approach. Segunda edición. (Eds. R.J.Benyon y J.S.Bond): 105-130.
- Sambrook, T., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** 1987. Molecular cloning. A laboratory manual. Segunda edición. ColdSpring Harbor Laboratory Press.
- Sanderson, M.P., Erickson, S.N., Gough, P.J., Garton, K.J., Wille, P.T., Raines, E.W., Dunbar, A.J., Dempsey, P.J.** 2005. ADAM10 mediates ectodomain shedding of the betacellulin precursor activated by p-aminophenylmercuric acetate and extracellular calcium influx. *J. Biol. Chem.* 280(3): 1826-1837.
- Sayed, A., Nekl, E.R., Siqueira, H.A., Wang, H.C., Ffrench-Constant, R.H., Bagley, M., Siegfried, B.D.** 2007. A novel cadherin-like gene from western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera:Crysomelidae), larval midgut tissue. *Insect Mol. Biol.* 16(5): 591-600.
- Schlichting, K., Wilsch-Bräuninger, M., Demontis, F., Dahmann, C.** 2006. Cadherin Cad99C is required for normal microvilli morphology in *Drosophila* follicle cells. *J. Cell. Sci.* 119(6):1184-1195.
- Schnepf, H.E., Whiteley, H.R.** 1985. Delineation of a toxin-encoding segment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Biol. Chem.* 260: 6273-6280.

- Schnepf, J., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, E., Zeigler, D.R., Dean, D.H.** 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Revs.* 62: 775-806.
- Seals, D.F., Courtneidge, S.A.** 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 17(1): 7-30.
- Shao, Z., Cui, Y., Liu, X., Yi, H., Ji, J., Yu, Z.** 1998. Processing of delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 in *Heliothis armigera* midgut juice and the effects of protease inhibitors. *J Invertebr Pathol.* 72(1): 73-81.
- Sharma, A., Qadri, A.** 2004. Vi polysaccharide of *Salmonella typhi* targets the prohibitin family of molecules in intestinal epithelial cells and suppresses early inflammatory responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101(50): 17492-17497.
- Shimada, Y., Usui, T., Yanagawa, S., Takeichi, M., Uemura, T.** 2001. Asymmetric colocalization of Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, and Dishevelled in planar cell polarization. *Curr. Biol.* 11(11):859-863.
- Sick, A.J., Gaerter, F., Wong, A.** 1990. Nucleotide sequence of a coleopteran active toxin gene from a new isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*. *Nucleic Acids Res.* 18(5): 1305.
- Simons, K., Ikonen, E.** 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387(6633): 569-572.
- Simons, K., Toomre, D.** 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1(1):31-39.
- Soberón, M., Gill, S.S., Bravo, A.** 2009. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells?. *Cell. Mol. Life Sci.* 66:1337- 1349.
- Soberón, M., Pardo-López, L., López, I., Gómez, I., Tabashnik, B.E., Bravo, A.** 2007. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science.* 318 (5856):1640-1642.
- Stewart, G.S., Johnstone, A.B., Hagelberg, K., Ellar, D.J.** 1981 .Commitment of bacterial spores to germinate. A measure of the trigger reaction. *Biochem. J.* 196: 101-106.
- Stöcker, W., Bode, W.** 1995. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*3: 383-90.

- Stöcker, W., Zwilling, R.** 1995. Astacin. En: Barrett, A.J. (Eds) *Methods in Enzymology, Proteolytic Enzymes: Aspartic and Metallo Peptidases*. Academic Press, London. 248(19): 307-308.
- Tan, J., Salgado, V.L., Hollingworth, R.M.** 2008. Neural actions of imidacloprid and their involvement in resistance in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Pest. Manag. Sci.* 64(1): 37-47.
- Tellier, E., Canault, M., Poggi, M., Bonardo, B., Nicolay, A., Alessi, M.C., Nalbone, G., Peiretti, F.** 2008. HDLs activate ADAM17-dependent shedding. *J. Cell Physiol.* 214(3): 687-693.
- Tellier, E., Canault, M., Rebsomen, L., Bonardo, B., Juhan-Vague, I., Nalbone, G., Peiretti, F.** 2006. The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Exp. Cell Res.* 312(20): 3969-3980.
- Terashima, M., Kim, K.M., Adachi, T., Nielsen, P.J., Reth, M., Köhler, G., Lamers, M.C.** 1994. The IgM antigen receptor of B lymphocytes is associated with prohibitin and a prohibitin-related protein. *EMBO J.* 13(16):3782-3792.
- Terra, W.R., Costa, R.H., Ferreira, C.** 2006. Plasma membranes from insect midgut cells. *An. Acad. Bras. Cienc.* 78: 255-269.
- Terra, W.R., Ferreira, C.** 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B: 1-62.
- Thomas, W.E., Ellar, D.J.** 1983. *Bacillus thuringiensis* var israeliensis δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell. Sci.* 60: 181-197.
- Vadlamudi, R.K., Ji, T.H., Bulla, L.A., Jr.** 1993. A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. berliner. *J. Biol. Chem.* 268:12334-12340.
- Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, I., Ji, T.H., Bulla, L.A. Jr.** 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270: 5490-5494.
- Vaje, S., Mossakowski, D., Gabel, D.** 1984. Temporal, intra- and interspecific variation of proteolytic enzymes in carabid-beetles. *Insect Biochem.* 14: 313-320.
- Vitavska, O., Merzendorfer, H., Wieczorek, H.** 2005. The V-ATPase subunit C binds to polymeric F-actin as well as to monomeric G-actin and induces cross-linking of actin filaments. *J. Biol. Chem.* 280(2): 1070-1076.

- von Tresckow, B., Kallen, K.J., von Strandmann, E.P., Borchmann, P., Lange, H., Engert, A., Hansen, H.P.** 2004. Depletion of cellular cholesterol and lipid rafts increases shedding of CD30. *J. Immunol.* 172(7): 4324-4331.
- Wagner, W., Möhrle, F., Schnetter, W.** 2002. Characterization of the proteolytic enzymes in the midgut of the European Cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 32(7): 803-814.
- Wakatsuki, S., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A.** 2004. Lipid rafts identified as locations of ectodomain shedding mediated by Meltrin beta/ADAM19. *J. Neurochem.* 89(1): 119-123.
- Walters, F.S., Stacy, C.M., Lee, M.K., Palekar, N., Chen, J.S.** 2008. An engineered chymotrypsin/cathepsin G site in domain I renders *Bacillus thuringiensis* Cry3A active against western corn rootworm larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(2): 367-374.
- Wang, G. R., Liang, G. M., Wu, K. M., Guo, Y.Y.** 2005. Gene cloning and sequencing of aminopeptidase N3, a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Ac toxin in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Eur. J. Entomol.* 102: 13-19.
- Warren, G.** 1997. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. En: *Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants*. Eds. Carozzi, N., Koziel, M. 109–21. London: Taylor & Francis.
- Wieczorek, H., Brown, D., Grinstein, S., Ehrenfeld, J., Harvey, W.R.** 1999. Animal plasma membrane energization by proton-motive V-ATPases. *Bioessays.* 21(8): 637-648.
- Wilke, G.A; Bubeck Wardenburg, J.** 2010. Role of a desintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* α -hemolysin-mediated cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 107(30): 13473-13478.
- Winter, A., Kämäräinen, O., Hofmann, A.** 2007. Molecular modeling of prohibitin domains. *Proteins.* 68(1): 353-362.
- Wolf, A.A., Jobling, M.G., Wimer-Mackin, S., Ferguson-Maltzman, M., Madara, J.L., Holmes, R.K., Lencer, W.I.** 1998. Ganglioside structure dictates signal transduction by cholera toxin and association with caveolae-like membrane domains in polarized epithelia. *J. Cell Biol.* 141: 917-927.
- Wolfersberger, M.G.P., Luthy, A., Maure, P., Pareti, F.V., Sacchi, Giordana, B., Hanozet, G.M.** 1987. Preparation and partial characterization of aminoacid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* 86: 301-308.

- Woods, D.F., Wu, J.W., Bryant, P.J.** 1997. Localization of proteins to the apico-lateral junctions of *Drosophila* epithelia. *Dev. Genet.* 20(2): 111-118.
- Wu, S., Dean, D.H.** 1996. Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIII A delta-endotoxin. *J. Mol. Biol.* 255(4):628-640.
- Wu, S., Koller, C.N., Miller, D.L., Bauer, L.S., Dean, D.H.** 2000. Enhanced toxicity of *B. thuringiensis* Cry3A δ -endotoxin in coleopterans by mutagenesis in a receptor binding loop. *FEBS Lett.* 473: 227-232.
- Xu, X., Yu, L., Wu, Y.** 2005. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 948-954.
- Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J., Cantley, L.C.** 1997. The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell.* 91(7): 961-971.
- Yaoi, K., Naknishi, K., Kadotani, T., Imamura, M., Koizumi, N., Iwahana, H., Sato, R.** 1999. cDNA cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin binding 120 kDa aminopeptidase N from *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1444: 131-137.
- Yap, K.L., Kim, J., Truong, K., Sherman, M., Yuan, T., Ikura, M.** 2000. Calmodulin target database. *J. Struct. Funct. Genomics*1(1): 8-14.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Taissing, R., Bulla, L.A.Jr.** 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 9897-9902.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Rose-Young, L., Bulla, L.A. Jr.** 2005. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death Differ.* 12(11): 1407-1416.
- Zhang, X., Griko, N.B., Corona, S.K., Bulla, L.A. Jr.** 2008. Enhanced exocytosis of the receptor BT-R(1) induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* directly correlates to the execution of cell death. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 149(4): 581-588.
- Zhu, P., Sang, Y., Xu, H., Zhao, J., Xu, R., Sun, Y., Xu, T., Wang, X., Chen, L., Feng, H., Li, C., Zhao, S.** 2005. ADAM22 plays an important role in cell adhesion and spreading with the assistance of 14-3-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331(4): 938-946.

Zhu, P., Sun, Y., Xu, R., Sang, Y., Zhao, J., Liu, G., Cai, L., Li, C., Zhao, S. 2003. The interaction between ADAM22 and 14-3-3 zeta: regulation of cell adhesion and spreading. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301(4): 991-999.

Zhu, Y-C., Baker, J.E. 2000. Molecular cloning and characterization of a midgut chymotrypsin-like enzyme from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 43:173-184.

Zhuang, M., Oltean, D.I., Gómez, I., Pullikuth, A.K., Soberón, M., Bravo, A., Gill, S.S. 2002. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J. Biol. Chem.* 277: 13863-13872.

Zimina, E.P., Bruckner-Tuderman, L., Franzke, C.W. 2005. Shedding of collagen XVII ectodomain depends on plasma membrane microenvironment. *J. Biol. Chem.* 280(40): 34019-34024.