

## ***Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas**

**Mario Soberón y Alejandra Bravo**

*Departamento de Microbiología Molecular/ Instituto de Biotecnología/ Universidad Nacional Autónoma de México. Ap. Postal 510-3. Cuernavaca 62250, Morelos. México*

*Bacillus thuringiensis* (Bt) (Fig 1) es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta, morfológicamente relacionada con *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis* (34). Estas tres especies bacterianas, durante su ciclo de vida, presentan dos fases principales, la fase de crecimiento vegetativo en donde las bacterias se duplican por bipartición cada 30-90 min dependiendo del medio de cultivo y la fase de esporulación, la cual es un programa de diferenciación de bacteria a espora. El programa de diferenciación consta de siete estadios, se dispara cuando la bacteria se encuentra en limitación de nutrientes (3). La espora es una forma de vida latente que puede permanecer en el ambiente por periodos de tiempo muy largos (años) en ausencia de humedad y nutrientes. Cuando la espora se encuentra de nuevo en un medio rico que contenga los nutrientes necesarios puede germinar para comenzar de nuevo el crecimiento vegetativo.

Bt es considerada una bacteria ubicua ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos sistemas como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc. A Bt se le diferencia de *B. cereus* y *B. anthracis* por contener un cuerpo parasporal conocido como cristal, el cual es de naturaleza protéica y tiene propiedades insecticidas. Está constituido por proteínas denominadas  $\delta$ -endotoxinas también conocidas como proteínas Cry y Cyt. Se han encontrado  $\delta$ -endotoxinas activas contra insectos lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y también contra otros invertebrados como nemátodos, gusanos planos y protozoarios (20). La primera bacteria fue aislada del gusano de seda en 1902 (Fig 2). Durante muchos años se pensó que Bt era un patógeno de lepidópteros porque solo se aislaron cepas activas contra este tipo de insectos. En 1978, se encontró una bacteria Bt subsp. *israelensis* capaz de matar mosquitos y en 1983 una Bt subsp. *tenebrionis* activa contra insectos coleópteros. Fue a partir de entonces que un gran número de investigadores en todo el mundo se dedicó a buscar más de estas bacterias y se han encontrado una gran diversidad de estas, las cuales se han caracterizado por su serotipo H-flagelar o sea por las proteínas presentes en el flagelo en más de 45 serotipos y 58 serovariedades diferentes (66).

Poco se sabe sobre el habitat natural de Bt sin embargo dado su requerimiento vitamínico y de algunos aminoácidos como glutámico, así como a su actividad bioinsecticida, se piensa que la forma de vida vegetativa solo se presenta en el interior de insectos que infecta hasta que esporula y es liberado al medio ambiente donde permanece en forma de esporas, lo que explica su amplia distribución (66).

En especies de *Bacillus*, la endospora se desarrolla en un esporangio que consiste de dos compartimentos celulares conocidos como la célula madre y la espora. Las proteínas insecticidas se acumulan en la célula madre durante el proceso de esporulación. En la figura 3 se muestra las diferentes etapas del proceso de esporulación y la acumulación del cristal insecticida. Este programa de diferenciación involucra la regulación de muchos genes en el tiempo y en el espacio a través de la utilización de múltiples factores sigma que se expresan a diferentes tiempos en los dos compartimentos

(33). En el estadio I se inducen los genes que iniciarán la esporulación. Este punto puede ser reversible si se adicionan nutrientes. Sin embargo, a partir del estadio II de esporulación, el proceso es irreversible y continua hasta finalizar con la formación de la espora. En el estadio II, la bacteria forma un septo de división asimétrico. En el estadio III, se inicia la síntesis del cristal insecticida, la cual continuará hasta el final de la esporulación. La síntesis del cristal insecticida se da a partir de dos promotores que funcionan secuencialmente (Bt1 y Bt2). El primero es activado por  $\sigma^E$  durante los estadios III y IV y el segundo por  $\sigma^K$  durante los estadios V y VI. Durante estos pasos se lleva conjuntamente la formación de la espora. Finalmente en el estadio VII se sintetizan enzimas líticas que liberan a las esporas y los cristales insecticidas (3).

### **Factores de virulencia producidos por *Bacillus thuringiensis***

Además de las  $\beta$ -endotoxinas, *B. thuringiensis* ha desarrollado una serie de factores de virulencia que le permiten infectar a sus blancos con mayor eficiencia. Entre estos factores de virulencia se encuentran: fosfolipasas (82), proteasas (51), quitinasas,  $\beta$ -exotoxinas o exotoxinas termolabiles (67), las  $\beta$ -exotoxinas, las cuales son toxinas que funcionan como análogos de ATP (46) y las proteínas VIP, que son proteínas insecticidas que se producen en la fase vegetativa del crecimiento (18). Las proteínas VIP se han cristalizado y contienen un dominio semejante al sitio activo de proteínas con actividad de ribosilación de ADP (Fig 4). Se propone que estos factores ayudan a la bacteria en la infección del insecto. Se ha reportado que en algunos casos la mezcla esporas/cristales mata mucho más eficiente que los cristales solos.

### **Clasificación de las $\beta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis***

Como se mencionó, existen dos tipos de  $\beta$ -endotoxinas: las proteínas Cry y las proteínas Cyt (Fig 4). A la fecha se han clonado y secuenciado 166 diferentes genes *cry* y 16 diferentes genes *cyt*. La primera clasificación de las  $\beta$ -endotoxinas se basó en la especificidad de la actividad insecticida (36). En esta clasificación las toxinas CryI eran las que presentaban actividad contra insectos lepidópteros, las toxinas CryII eran proteínas más pequeñas de 70 kDa, activadas contra lepidópteros y dípteros, las toxinas CryIII eran proteínas activas contra insectos coleópteros; las toxinas CryIV activas contra insectos dípteros y las CryV y CryVI activas hacia nemátodos, en donde el CryVI era un grupo que no tenía homología con el grupo CryV (19). Sin embargo, muy rápidamente se dieron cuenta que esta clasificación no era adecuada ya que empezaron a encontrar proteínas Cry que eran muy semejantes, pero con especificidad diferente ó toxinas Cry con actividad dual hacia lepidópteros y coleópteros, las cuales también las llamaron CryV, creando una gran confusión en la nomenclatura. Esto propició que se creara una nueva nomenclatura de las  $\beta$ -endotoxinas basada exclusivamente en la similitud de la secuencia primaria (11). En esta nueva nomenclatura los números romanos se cambiaron por números arábigos. La definición de proteínas Cry es cualquier proteína paraesporal de Bt que muestre un efecto tóxico hacia algún organismo, verificable por medio de bioensayos ó cualquier proteína que muestre similitud con las proteínas Cry. Actualmente se han encontrado toxinas Cry en otras especies de bacterias como *Clostridium bifermentans* (clasificadas como Cry17A,

Cry18A, y Cry19A con actividad hacia mosquitos) (2). Las proteínas Cyt denotan a las proteínas paraesporales de *Bt* que muestren actividad hemolítica ó tengan similitud a la secuencia de las toxinas Cyt.

A la fecha las proteínas Cry estan agrupadas en 28 grupos y varios subgrupos y las proteínas Cyt en dos grandes grupos y varios subgrupos. Cada grupo muestra una especificidad muy grande hacia ciertos tipos de insectos. La figura 5 muestra un filograma de las toxinas Cry descritas a la fecha. Esta figura se actualizan constantemente y puede ser visualizadas via Internet en la siguiente dirección URL : [http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/). En esta dirección se encuentran tambien los números de acceso al GenBank y las referencias de cada proteína Cry y Cyt. Esta figura fué construida utilizando como base un alineamiento multiple de todas las secuencias utilizando el programa CLUSTAL W (73), posteriormente las relaciones filogenéticas de estas secuencias se analizaron con el programa NEIGHBOR (21) y la matrix de distancia Dayhoff PAM (21).

Las lineas verticales presentes en la figura 5 representan los límites en identidad que marcan las diferentes categorias en la nomenclatura. El número arábigo se designa con la primera fila que corresponde hasta 45 % de identidad. La segunda hilera cataloga a las proteínas con una letra mayuscula y corresponde a identidades de 45 a 78 %. La tercera fila asigna una letra minúscula y corresponde a identidades de 78 a 95 %. La última fila incluye un número arábigo al final de la nomenclatura indicando mas de 95 % de identidad.

Es importante señalar que al hacer el análisis filogenético algunos grupos de secuencias mostraron tener distancias infinitas, lo que indicaba que estas secuencias eran muy diferentes y por lo tanto fueron tratadas como grupos independientes. Este es el caso de las toxinas Cyt, Cry6, Cry15 y Cry22. Es probable que estas toxinas tengan estructuras y mecanismos de acción diferentes al resto de la familia Cry.

Uso de *Bacillus thuringiensis*: ventajas y limitaciones.

Se ha estimado que el 2% del mercado mundial de pesticidas es satisfecho con biopesticidas, en el que *Bt* domina el 95% de las ventas (62). Varios han sido los factores que han hecho posible su éxito en la agricultura. El más importante es su alta especificidad hacia el insecto blanco y su inocuidad para mamíferos, otros vertebrados, plantas e inclusive otros insectos benéficos (62). Las toxinas de *Bt* se han utilizado como bioinsecticidas en agricultura durante los últimos 40 años, principalmente en cultivos de hortalizas y cereales. Sólo existe un ejemplo de generación de resistencia a *Bt* en campo (67). Esto se debe a que los tiempos de permanencia de las proteínas Cry en el ambiente son muy cortos, por lo que la presión de selección es muy baja. En este sentido, *Bt* ha sido utilizado como una alternativa compatible con el medio ambiente para el manejo de plagas agrícolas. Paradójicamente, las ventajas de *Bt* se convierten en importantes desventajas para su uso comercial. El estrecho rango de huésped ocasiona que no se cuente con toxinas para cada plaga que afecta la actividad humana. El reducido tiempo de permanencia en el ambiente hace necesario un profundo conocimiento de la biología y comportamiento de la plaga que se quiere controlar ya que una toxina puede ser activa para los estadios larvarios, pero disminuir o incluso no ser tóxica para los adultos (67). Por lo tanto, los tiempos y formas de aplicación deben ser cuidadosamente seleccionados. Otra limitante ha sido la utlización de *Bt* para el control de insectos barrenadores y chupadores ya que la aplicación de productos de *Bt* se ha dado tradicionalmente como productos asperjados y el hábito alimenticio de estos insectos

impide la ingestión de la toxina Cry. Este problema se ha resuelto con la creación de plantas transgénicas que producen sistémicamente la toxina Cry haciéndola accesible a insectos barrenadores. Por último, existe el riesgo de desarrollo de resistencias por el incremento en el uso de *Bt*, como aspersiones de cristales y sobre todo en plantas transgénicas que expresen constitutivamente una o varias toxinas Cry. Esto podría sustituir gradualmente las poblaciones sensibles por otras resistentes (22), con lo cual no sólo se vería reducida la efectividad del bioinsecticida, sino que se reduciría la variabilidad genética de las poblaciones de insectos. Una de las estrategias más atractivas y a la vez más controvertidas, se refiere a la transformación de las plantas de cultivo con los genes heterólogos. Esta estrategia se desarrolló como consecuencia de los avances en las técnicas de ingeniería genética de plantas. El objetivo es que la planta, una vez transformada con el gene de la toxina, exprese suficiente cantidad de ésta como para aniquilar a las plagas susceptibles que las consumen. Desde 1987 aparecieron los primeros reportes sobre plantas de tabaco y tomate que presentaban suficiente expresión de la toxina de *Bt* como para conferir niveles altos de resistencia. En la actualidad, universidades, centros de investigación y compañías privadas, llevan a cabo proyectos ambiciosos sobre el desarrollo de plantas transgénicas con capacidad insecticida. Esta ha extendido hacia una gran variedad de plantas de importancia económica. La adopción de las plantas transgénicas en la agricultura se está llevando a cabo en forma vertiginosa. Sólo en Estados Unidos, el 50% de la superficie sembrada con soya consistió de plantas transgénicas resistentes a herbicidas. En la actualidad existen 8 cultivos importantes con cultivares transgénicos registrados: soya, maíz, algodón, canola, papa, tomate, tabaco y remolacha, y muchas otras plantas están próximas a registrarse. Las dos principales características transgénicas comercializadas hasta la fecha son la tolerancia a herbicidas y la resistencia a plagas basadas en genes de *Bt*. La introducción de plantas transgénicas a nuestro país ha sido estrictamente regulada, y el caso de la introducción de maíz transgénico reviste singular importancia, dado que Mesoamérica es el sitio del origen evolutivo del maíz y aún existen sus posibles ancestros. Sería aconsejable evaluar el posible impacto que el maíz transgénico pudiera tener sobre las poblaciones de estos ancestros del maíz, analizando la posibilidad de que los transgenes eventualmente pudiera introducirse a estas plantas silvestres. Sin embargo un uso racional de esta tecnología en nuestro país sin duda redundara en mayor producción al resolver el grave problema agrícola del ataque de insectos.

### **Distribución de genes Cry en la naturaleza: El caso de México**

Se ha sugerido que la gran diversidad de los genes *cry* se generó, en parte, por la co-evolución de estos genes con las diferentes especies de insectos blanco. Esto sugiere que podría haber una distribución de los genes *cry* en la naturaleza directamente relacionada con la distribución de diferentes especies de insectos. En particular, el territorio mexicano es un sitio atractivo para estudiar la distribución de genes *cry* en la naturaleza, ya que México tiene una variedad importante de nichos ecológicos y una gran diversidad de especies de insectos.

Con el proposito de contar con una colección de cepas que permitiera estudiar la distribución de los diferentes genes *cry* en México así como para poder identificar genes *cry* potencialmente nuevos, se aislaron cepas de *Bt* de 503 suelos provenientes de cinco macroregiones de México (Fig 6) (8). Las muestras de suelos provenian de campos

cultivados (maíz, sorgo, arroz, caña de azúcar, frijol, chícharo, café, cacao, alfalfa, chile poblano, agave, durazno, mango, papaya, melón, tomate, calabaza, cebolla, brócoli y zanahoria) o vegetación natural (bosque de pinos, selva tropical, selva temperada y pastizales) en sitios donde nunca se había aplicado Bt. La altitud de los sitios donde se tomaron muestras de suelos varió del nivel del mar hasta 2,900 metros sobre el nivel del mar. Cincuenta muestras de suelo se colectaron de la zona Norte del Pacífico (Sonora, Sinaloa y Nayarit) y cuarenta y cuatro suelos de la región Norte (Durango, Zacatecas y San Luis Potosí). Estas dos regiones corresponden a lo que denominamos estepa árida. Ciento ochenta y ocho suelos se colectaron de la meseta central (Jalisco, Guanajuato, Morelos y Puebla) que corresponden a climas templados y fríos. Cincuenta suelos se colectaron de la región del Golfo de México (Veracruz y Tabasco) y ciento sesenta y seis suelos se colectaron de la región Pacífico-Sur (Chiapas y Oaxaca). Las últimas dos regiones tienen climas tropicales. Se aislaron cepas de Bt en 456 de los 503 suelos analizados (8). De 8,179 cepas observadas en el microscopio se seleccionaron 1,948 que producían cristal proteico durante la fase de esporulación. Se eliminaron las cepas hermanas a través de comparar el perfil de proteínas producidas en cepas provenientes del mismo suelo. Al final de este proceso se seleccionaron 496 cepas de *Bacillus thuringiensis* (8).

Se caracterizó el contenido de genes *cry* en las 496 cepas seleccionadas. Esto se realizó a través de amplificar selectivamente la mayoría de los genes *cry*, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada grupo (e.g. *cry1*) o subgrupo (*cry1A*, *cry1B* etc.) de genes. Además los oligonucleótidos fueron diseñados de manera que cada gene ya descrito diera una banda de un tamaño particular. De esta manera fue posible identificar genes potencialmente nuevos como aquellos en que las bandas de PCR tenían un tamaño diferente al esperado o que daban un producto de PCR con los oligonucleótidos generales de un grupo pero que no con los oligonucleótidos específicos para cada subgrupo o también cepas que no daban ningún producto de PCR pero que si produjeran el cristal proteico. En la figura 7 se muestra un resumen del contenido de genes *cry* en las cepas de Bt Mexicanas. Las cepas que contienen genes *cry1* fueron las más abundantes representando el 49 %. Cepas con genes *cry3* fueron el 22 %, mientras que cepas conteniendo genes *cry11* y *cyt* fueron el 8%. Las cepas conteniendo *cry7*, *cry8*, y *cry9* fueron muy pocas. Finalmente, 14 % de las cepas no dieron ningún producto de PCR a pesar de que producían cristales proteicos, por lo que estas cepas son candidatas para portar genes *cry* nuevos y con la potencialidad de matar a otros insectos (8).

En la figura 6 se muestra la distribución geográfica de los genes *cry* potencialmente nuevos, mostrando que en la zona tropical es donde es más frecuente aislar cepas con genes *cry* potencialmente nuevos. Cabe destacar que la diversidad de especies de insectos es mayor en estas regiones. También en la zona tropical es más frecuente el aislamiento de cepas de Bt que portan genes *cyt* y *cry11* los cuales son específicos para insectos dípteros; esta distribución correlaciona con la mayor abundancia de insectos dípteros en estas regiones (8). Por otra parte se encontró que también hay una mayor frecuencia de cepas con genes *cry1E* y *cry1F* en la región tropical. Estos genes son tóxicos para insectos del género *Spodoptera*. Sin embargo no hay una clara diferencia en la distribución de estos insectos en las diferentes regiones analizadas. Estos datos sugieren que si existe una correlación entre la distribución de insectos y la distribución de genes *cry* en el medio ambiente, pero es necesario analizar una cantidad mayor de

colecciones y su posible correlación con la distribución de insectos para poder llegar a conclusiones más firmes sobre la distribución de Bt y de sus genes *cry* en la naturaleza.

### **Mecanismo de acción de las proteínas Cry**

Los síntomas que se observan a partir de que las larvas de insectos susceptibles ingieren los cristales y esporas de Bt son: cese de la ingesta, parálisis del intestino, vómito, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte (1). La figura 8 muestra una foto de una larva infectada por Bt, como se puede observar la larva presenta un color negro característico de las infecciones por Bt. Los estudios histopatológicos han mostrado que las células columnares del intestino medio son las estructuras afectadas inicialmente y en particular, la microvellosidad apical, la cual se destruye en su totalidad (16, 59) (Fig 9). Los efectos en el otro tipo de células de las que está constituido el intestino medio de los lepidópteros, las células caliciformes, son más lentos, pero estas caso también se ha observado citólisis (7, 31).

El mecanismo de acción de las proteínas Cry es un proceso de varios pasos: solubilización del cristal, procesamiento de las protoxinas, unión al receptor, inserción a la membrana, agregación, formación de poro y citólisis. En la figura 10 se muestra un esquema donde se presentan los diferentes eventos en el modo de acción de las proteínas Cry.

**Solubilización y procesamiento de las protoxinas Cry.** Los cristales producidos por Bt se solubilizan a pH alcalino liberando a la “protoxina” (29) también se requiere un medio ambiente reductor para romper los puentes disulfuro que son abundantes en la mitad C-terminal de las proteínas Cry de 130 kDa (42). El intestino medio de la mayor parte de las larvas de insectos susceptibles (lepidópteros, dípteros y algunos grupos de coleópteros) se caracteriza por su alto pH y condiciones reductoras (42).

La mayor parte de las proteínas Cry se producen como protoxinas, que para ser activas deben ser procesadas por las proteasas del intestino medio de los insectos liberando el fragmento tóxico. Puede generalizarse que el procesamiento típico de las toxinas Cry1 se da por el corte de los primeros veintiocho residuos del extremo N-terminal en un sitio conservado (14) y de los últimos 500 residuos del extremo C-terminal, quedando de esta forma un fragmento resistente a proteasas de entre 55 y 65 kDa que se le denomina “toxina”. La posición del sitio de procesamiento en el extremo C-terminal no es constante sino que se localiza en la región 609 a 630 (78, 56, 72).

La estructura tridimensional determinada por difracción de rayos X de la porción tóxica de las proteínas Cry3A (47) y Cry1Aa (30), ha revelado que estas moléculas están organizadas en tres dominios (Fig 4). El dominio I está constituido por un ramillete de siete  $\alpha$ -hélices anfipáticas donde seis de ellas rodean a la  $\alpha$ -hélice 5. El dominio II está formado por tres láminas  $\beta$ -antiparalelas que terminan en asas ("loops 1, 2 y 3") en el vértice de la molécula formando un prisma. El dominio III está compuesto de dos hojas  $\beta$ -plegadas arregladas en forma de empanado una sobre otra.

Todas las toxinas Cry presentan cinco bloques conservados en su secuencia de aminoácidos que se localizan en las regiones centrales y de contacto entre los dominios. La localización estratégica de estas regiones permite inferir que los miembros de la

familia Cry que las contengan podrían tener un plegamiento similar y por lo tanto un mecanismo de acción semejante.

**Unión al receptor.** Se ha demostrado que después de ser activadas, las proteínas Cry se unen a sitios específicos localizados en la microvellosidad de las células columnares del intestino medio de las larvas de insectos susceptibles: lepidópteros (35), coleópteros (7) y dípteros. La figura 11 muestra una inmunolocalización de la unión de la toxina Cry1Ab a la microvellosidad apical de las células del intestino de *Manduca sexta*.

La unión a estos sitios es muy específica, como la de una llave con su cerradura, es una etapa determinante en la toxicidad (77) por lo que diversos grupos de investigación han dedicado un gran esfuerzo a entender cómo ocurre este proceso. La mayor parte de los análisis se han hecho con larvas de lepidópteros y toxinas de tipo Cry1 (61), y algunos estudios con la toxina Cry3A y el coleóptero *Tenebrio molitor* (4).

De los resultados obtenidos en los estudios de competencia se puede generalizar que la constante de disociación ( $K_d$ ) entre las toxinas y sus sitios de unión para el caso de los lepidópteros es del orden de 0.2 a 50 nM, y que la concentración de sitios de unión ( $B_{max}$ ) va de 0.4 a 62 pmoles/mg de proteína de vesículas (61). Para el caso de la toxina Cry3A y las VMMA de *T. molitor* se determinó que la  $K_d$  y  $B_{max}$  es de 17.5 nM y 304 pmoles/mg de proteína de vesículas, respectivamente (4). Los estudios de competencia homóloga han mostrado que la cinética de unión de las toxinas Cry a las VMMA de los insectos susceptibles es bifásica, compuesto de un paso reversible y otro irreversible (77, 49). La interacción inicial entre la toxina y su sitio de unión (unión reversible) es un requisito para la toxicidad pero no es suficiente. Los eventos posteriores tales como la unión irreversible y la inserción en la membrana parecen estar más correlacionados con la toxicidad.

Las regiones de la toxina que participan en la interacción con el receptor se localizan en los dominios II y III. Estas regiones se han identificado por medio de análisis de mutantes sitio-dirigidas. Se ha determinado que las cuatro regiones prominentes en esta interacción en el dominio II son: el loop de la  $\alpha$ -hélice 8 y las loops 1 (entre  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ), 2 (entre  $\alpha 6$  y  $\alpha 7$ ) y 3 (entre  $\alpha 10$  y  $\alpha 11$ ). La función de cada una de estas regiones puede ser diferente en los distintos insectos susceptibles. Por ejemplo, los residuos que conforman el loop de la  $\alpha$ -hélice 8 de Cry1Ab son importantes para la interacción inicial con el receptor en *Lymantria dispar*. Sin embargo, esta misma región no es importante en otras especies de insectos sensibles como *M. sexta* y *H. virescens* (45).

Algunas mutaciones afectan la etapa inicial de la interacción con el receptor (unión reversible) produciendo proteínas con menor afinidad y con menor toxicidad. Este es el caso de las mutaciones en el loop 1 de la toxina Cry3A, que pierden su habilidad para unirse al receptor y su toxicidad hacia *T. molitor*, (80). El loop 3 de la toxina Cry1Ab también es importante en la interacción inicial con el receptor, las mutantes en esta región son 13-100 veces menos tóxicas (12). También la delección de una gran parte del loop 2 en Cry1Aa ( $^{365}$ LYRRIL $^{371}$ ) o su sustitución por alaninas provocó una pérdida sustancial de la unión inicial con el receptor y la toxicidad hacia *Bombyx mori* (52).

Otras mutaciones causan cambios en la segunda etapa de la interacción con el receptor (la unión irreversible) conduciendo también a una baja toxicidad. Este es el caso de las mutaciones en el loop 1 de la toxina Cry1Ac, donde el aminoácido G312 participa en la interacción irreversible con el receptor en *M. sexta* (71). Otro ejemplo

son las mutantes en las que se eliminó la región <sup>371</sup>FNIGI<sup>375</sup> del loop 2, así como modificaciones puntuales (F371A y G374A) que perdieron cerca de 400 veces su potencia hacia *M. sexta*, pero no mostraron un cambio significativo en los parámetros de unión, sino en la unión irreversible con el receptor (63). Experimentos posteriores en los que el residuo F371 se reemplazó por Cis, Val, Ser, Lis, Thr y Trp mostraron que la toxicidad de Cry1Ab hacia *M. sexta* está correlacionada con el tamaño e hidrofobicidad del aminoácido de esta posición.

La mutagenesis del dominio II ha generado toxinas con mejores parámetros de unión que resultaron ser más tóxicas. Un ejemplo de esto es el caso de la toxina Cry1Ab N372A-A282G-L283S; esta mutante presenta una afinidad de 18 veces mayor y resultó ser 36 veces más tóxica que la toxina silvestre hacia *L. dispar* (64). Este dato demuestra que es posible hacer más efectivas o ampliar el rango de acción de las toxinas Cry a través de mutagénesis, lo cual tiene un gran impacto biotecnológico para la producción de mejores bioinsecticidas.

El dominio III también participa en la determinación de la especificidad (10). La construcción de proteínas quiméricas entre Cry1C y Cry1Ea mostró que el dominio III de la primera es determinante para la especificidad hacia *Spodoptera exigua* y *Mamestra brassicae* (7, 13). Incluso, la quimera entre las proteínas Cry1Ab y Cry1C resultó en una proteína 10 veces más tóxica hacia *S. exigua* (13) que la toxina Cry1C.

Se han hecho importantes esfuerzos dirigidos a la identificación, purificación y caracterización del receptor de las proteínas Cry, en la microvellosidad apical de las células columnares del intestino medio. Se ha encontrado que para la mayoría de las toxinas Cry1 estudiadas, las moléculas a las que se unen con alta afinidad son glicoproteínas de entre 63 y 220 kDa (32, 58, 23, 41, 38). Se propone que la interacción inicial es la existente entre la toxina y el carbohidrato del receptor, mientras que la unión irreversible se asocia con una interacción proteína-proteína.

Este tipo de estudios es aún incipiente para el caso de los coleópteros y los dípteros. Se encontró que en el coleóptero *T. molitor* la molécula de unión es una proteína de 144 kDa (4), mientras que una de 148 kDa y otra de 78 kDa se identificaron como las proteínas de unión para la toxina Cry11Aa en las vesículas de los mosquitos *Anopheles stephensi* y *Tipula oleracea* (18), respectivamente.

En la Tabla 1 se enlistan los resultados sobre el esclarecimiento de la naturaleza bioquímica de los receptores para las proteínas Cry1. Las proteínas de unión para las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1C son miembros de la familia de las aminopeptidasas de tipo N con peso molecular cercano a 120 kDa. Para las toxinas Cry1A en *M. sexta*, *B. mori* y *L. dispar* se encontró que además se une a un miembro de la familia de las caderinas (75). La aminopeptidasa N (APN) está unida a la membrana mediante un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (24). El ancla de GPI es susceptible a la acción de una fosfolipasa C específica endógena del insecto que la convierte en una forma soluble de 115 kDa (53). Esta forma soluble retiene su capacidad de unirse a la toxina y lo hace de manera específica. Se ha demostrado que el azúcar *N*-acetil-D-galactosamina (NACGal) inhibe de manera específica la unión entre la APN y la toxina Cry1Ac en *M. sexta* (43), *H. virescens* (25), *L. dispar* (676) y *P. xylostella* (55). Esto sugiere que la proteína de unión de Cry1Ac es un glico-conjugado que contiene NAGal y que este azúcar participa directamente en la interacción entre ésta y la toxina.

El modelo vigente del mecanismo de acción establece que después del procesamiento proteolítico, la toxina se une a receptores encontrados en las

microvellosidades de las células del epitelio intestinal (66,14). La interacción de las toxinas Cry con sus receptores es sin duda el paso más importante en la determinación de la especificidad de las toxinas ya que hay una correlación estrecha entre unión a receptores y toxicidad. El poder determinar los sitios de interacción de las toxinas con sus receptores sin duda dara herramientas que permitan manipular la especificidad y toxicidad de estas proteínas.

Como se menciona anteriormente, las proteínas que se han propuesto como posibles receptores de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac son la aminopeptidasa N (APN) y una proteína de la familia de las caderinas (caderina E). La aminopetidasa N es una proteína con masa aparente de 120 kDa que se encuentra anclada a la membrana a través de un grupo glicosil-fosfatidil- inositol (GPI) mientras la caderina E tiene una masa de 210 kDa. Diferentes evidencias experimentales sugieren que ambos receptores estan involucrados en la actividad tóxica de las proteínas Cry. Poco se sabe todavía sobre las bases moleculares que determinan la interacción entre proteínas. Sin embargo, se ha descrito que varias interacciones entre ligandos y receptores así como la interacción antígeno-anticuerpo estan determinadas por regiones que tienen una complementariedad hidropática (6). Estas observaciones fundamentan una teoría de reconocimiento molecular que indica que los epitopes de interacción entre diferentes proteínas tienen perfiles de hidropatía inversos (6).

En cuanto a las regiones de los receptores involucradas en la unión de la toxina se sabe poco. Recientemente, se identificó un epítoto dentro de la caderina de *M. sexta* (<sup>865</sup>NITIHITDTNNK<sup>876</sup>) que está involucrado en la interacción toxina-receptor. Este epítoto es una región discreta de 11 aminoácidos que es capaz de competir la unión de las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab a la caderina y de inhibir la toxicidad a larvas de *M. sexta* cuando se administra *in vivo* (26). Experimentos de competencia de unión utilizando peptidos sintéticos cuya secuencia corresponde a las asas del dominio II mostró que el asa 2 de este dominio es el epítoto de interacción de la toxina Cry1A con el epítoto <sup>865</sup>NITIHITDTNNK<sup>876</sup> de la caderina de *M. sexta*. Finalmente, el análisis de los perfiles de hidropatía de estos epítotos mostró que la interacción del asa 2 con la caderina está determinada por patrones hidropáticos complementarios (27). La figura 12 muestra un modelo molecular de la interacción de la toxina Cry1Ab con el epítoto <sup>865</sup>NITIHITDTNNK<sup>876</sup> del receptor tipo caderina (Bt-R<sub>1</sub>).

El identificar todos los epitopes en los receptores y en las toxinas permitirá proponer estrategias para mejorar la interacción de estas toxinas o incluso manipular su especificidad para hacerlas tóxicas a otros blancos (27).

**Inserción en la membrana y formación de poro.** A pesar de que hay una gran correlación de la unión de las toxinas Cry con sus receptores, la correlación más estricta se da entre la toxicidad y la unión irreversible de las toxinas Cry a la membrana (12). Dado que las toxinas Cry son solubles en medio acuoso se ha propuesto que la toxina sufre un gran cambio conformacional que permite la exposición de regiones hidrofóbicas y su inserción a la membrana. Experimentos de activación de la toxina Cry1Ab en presencia del epítoto <sup>865</sup>NITIHITDTNNK<sup>876</sup> mostró que la presencia de la caderina es requerida para inducir un cambio conformacional en la toxina que resulta en un procesamiento en el cual se pierde la hélice  $\alpha$ -1 y se forma un oligómero de 4 monómeros (28). Mediante experimentos con 8-anilino-1-naftalensulfonato (1,8-ANS), un colorante fluorescente que se une específicamente a superficies hidrofóbicas, se

demostró que la formación del oligómero expone una superficie hidrofóbica que podría ser importante en la inserción a la membrana. Estos datos muestran que el receptor juega un papel estrictamente necesario para la activación, la formación del oligómero y la subsiguiente penetración en la membrana (28).

Como se ha señalado anteriormente, la microvellosidad apical de las células epiteliales del intestino medio es la membrana blanco de estas toxinas, la cual contiene tanto la caderina como la APN. Sin embargo, se ha especulado acerca de la importancia de la composición lipídica como un factor que podría afectar la inserción. En los últimos años se ha descrito que la membrana plasmática no es sólo un cristal líquido compuesto por lípidos y proteínas, sino que existen regiones discretas que presentan una estructura mas ordenada por estar enriquecidas en esfingomelina, colesterol y fosfoesfingolípidos. Estos microdominios se han denominado como “rafts” o “balsas” y se sabe que están involucrados en diversos procesos celulares como señalización, tráfico de membranas e inserción de algunos virus a la célula (Figura 13). Las proteínas ancladas a membrana a través de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) se localizan preferencialmente en rafts o tras un estímulo se movilizan hacia ellos; tal es el caso de la aminopeptidasa N, receptor de las toxinas Cry1A. El aislamiento y caracterización de rafts del epitelio del intestino medio de dos insectos lepidópteros: *M. sexta* y *H. Virescens* mostró que la integridad de estos dominios de membrana son indispensable para la actividad de formación del poro *in vitro*, sugiriendo que ls toxinas Cry ejercen su acción de formación de poro en estos microdominios de membrana (83).

La fase irreversible de la unión de las proteínas Cry a la membrana se considera como una evidencia de que las proteínas Cry se insertan en la membrana, para luego causar la destrucción del tejido intestinal de las larvas de insectos susceptibles (49, 77).

Se han aislado algunas mutantes en el dominio I afectadas en la union irreversible y se propone que estas mutantes son incapaces de insertarse en la membrana, ya que estas mutantes involucran la introducción de una carga negativa (A92D) (79) o bien la eliminación de una carga positiva (R93) (37). Ambas mutantes se localizan en la cara inferior del dominio I que está expuesto hacia la membrana y se propone que estos cambios evitarían la interacción con la membrana, quien tiene carga negativa (Fig 4).

Se ha demostrado que a dosis  $\mu\text{M}$  (1000 veces más que la dosis letal media) las proteínas Cry son capaces de interactuar con membranas lipídicas artificiales e insertarse en las mismas, formando canales permeables principalmente a cationes (17) pero también a aniones y solutos neutros (50, 68, 81). Se comprobó que la capacidad de la toxina Cry1C para interactuar con una membrana modelo, aumenta de forma sustantiva al disminuir el pH ( $\text{pH} < 5$ ), y que esto está correlacionado con el aumento en la hidrofobicidad de la superficie de la molécula (9). Estos datos sugieren que en estas condiciones *in vitro*, la proteína sufre un cambio conformacional que la lleva a un estado competente para la inserción. Es posible que *in vivo* se logre una transición a un estado conformacional similar, por ejemplo, por la unión al receptor. Es importante señalar que a concentraciones fisiológicamente relevantes (pM-nM), las proteínas Cry no se insertan de manera espontánea en las membranas biológicas que carecen de los receptores específicos (42, 50).

Con base en el conocimiento que se tiene acerca de la inserción de otras toxinas bacterianas formadoras de poro (48, 60) se han propuesto dos modelos posibles de la inserción de toxinas Cry en la membrana (Fig 14). Un primer modelo (modelo del

abrecartas), propone que las  $\alpha$ -hélices 5 y 6 se insertan en la membrana como consecuencia de un cambio conformacional disparado por el receptor, sin mayor participación de las hélices y dominios restantes. El otro modelo (modelo de paraguas) plantea también que después de la unión con el receptor, se inserta la región  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5, mientras que el resto de las hélices se aplanan sobre la superficie de la bicapa lipídica exponiendo hacia ella su cara hidrofóbica quedando de esta manera la molécula en forma parecida a un paraguas (42). Existen evidencias que respalda este último modelo. Se introdujeron residuos de cisteína para formar puentes disulfuro entre algunas de las hélices del dominio I de la toxina Cry1Aa y así restringir el movimiento de la  $\alpha$ -5 y posteriormente se analizó la capacidad de estas proteínas para formar canales iónicos en bicapas lipídicas. Se encontró que a diferencia de la proteína silvestre, las mutantes fueron capaces de formar poros sólo en presencia de un agente reductor ( $\beta$ -mercaptoetanol) que rompe los puentes de disulfuro, lo que puso de manifiesto la necesidad de que las hélices  $\alpha$ -4 y  $\alpha$ -5 conserven flexibilidad en su estructura para una inserción y formación de poro eficiente (69). En este mismo estudio se demostró que un prerrequisito para la formación del canal es la separación del dominio I del resto de la molécula, ya que la mutante con un puente disulfuro en la interfase dominio I-II fue incapaz de formar canales en su estado oxidado. Por otro lado la mutante en hélice  $\alpha$ -4 en la que se cambió un aminoácido con carga negativa (aspártico 136) por uno sin carga (cisteína) resultó no tóxica y presentó una formación de poro muy baja. Se demostró que si se reconstituye la carga negativa de este residuo utilizando un reactivo con carga negativa que reacciona con grupos thiol presentes en la cisteína se regenera la capacidad de formar poros en membranas artificiales. Este dato sugiere fuertemente que la hélice  $\alpha$ -4 está localizada en el lumen del poro de la toxina (57).

Experimentos de protección osmótica demuestran que después de unirse al receptor e insertarse en la membrana, las proteínas Cry forman poros con un diámetro de 1 a 2 nm (40). El tamaño de estos poros y la aparición frecuente de múltiples estados de conductancia en los estudios de la actividad de las proteínas Cry en bicapas lipídicas planas (30, 6168,69,70) se han considerado como evidencias de la formación de diversos estados de agregación de las  $\alpha$ -endotoxinas. Se propone que se requieren cuatro toxinas Cry para formar un poro en donde las hélices 4 y 5 se encuentran insertadas en la membrana.

**Citólisis.** Se ha propuesto que las proteínas Cry causan la muerte de las células epiteliales al inactivar el sistema que mantiene el gradiente de pH y por citólisis osmótica (40). Las toxinas Cry aumentan la permeabilidad de la microvellosidad apical a cationes, aniones, agua y moléculas de mayor tamaño. Esto causa a su vez que se colapse la diferencia de potencial y por tanto se pierda la fuerza motriz que dirige la entrada de aminoácidos al interior celular, así como la redistribución de los cationes entre el lumen y el citoplasma. Se considera que el efecto más devastador de este proceso es la alcalinización del citoplasma, ya que éste interfiere con el metabolismo celular normal, que tiene como consecuencia final la destrucción del epitelio intestinal. Una vez que las células columnares y caliciformes se destruyen, las esporas de *Bt* tienen acceso al hemolinfa, medio en el que proliferan. La consecuencia final de la destrucción del intestino medio y la proliferación de bacterias en la hemolinfa es la muerte de las larvas por inanición y septicemia.

### ***Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis* y *Bacillus cereus*: Una sola especie bacteriana?**

Como se mencionó previamente, *B. thuringiensis* está estrechamente relacionado con las bacterias *B. anthracis* y *B. cereus*. *B. anthracis* es el agente causal de la enfermedad, con frecuencia letal, conocida como anthrax, mientras que *B. cereus* se le considera una bacteria de suelo y un patógeno oportunista del humano. En el caso de Bt los genes *cry* se encuentran usualmente en plásmidos de alto peso molecular, este es también el caso de los factores de virulencia de *B. anthracis* (74). Cuando los plásmidos que contienen los genes *cry* se pierden ya no es posible diferenciar a *B. thuringiensis* de *B. cereus* (74). Una diferencia importante de *B. thuringiensis* y *B. cereus* con *B. anthracis* es la mutación, en *B. anthracis*, de un factor transcripcional llamado PlcR el cual modula la expresión de genes que codifican para factores de virulencia extracelulares, lo cual explica algunas diferencias fenotípicas como son la ausencia de lecitinasas y de actividad hemolítica por *B. anthracis* (34). Un estudio de las relaciones filogenéticas de estas tres especies bacterianas comparando la secuencia de varios genes y por medio del análisis de isoformas de varias enzimas centrales del metabolismo, mostró que estas tres especies bacterianas son indistinguibles genéticamente (34). Esta relación tan estrecha entre Bt y bacterias patógenas como *B. anthracis*, pone en duda el dogma de que el liberar grandes cantidades de esporas de Bt al medio ambiente no causa ningún efecto nocivo, sobre todo si tomamos en cuenta que la transferencia horizontal de plásmidos puede alterar dramáticamente los fenotipos de virulencia de estas especies bacterianas. Es por esto que en algunos países se inactivan o matan las esporas por exposición a compuestos radioactivos y de esta manera se evita la liberación de grandes cantidades de esporas al ambiente.

### **Bibliografía**

1. **Aronson, A.I., Beckman, W. y P. Dunn** 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50, 1-24.
2. **Barloy, F., A. Delécluse, L. Nicolas, y M.M.Lecadet.** 1996. Cloning and expression of the first anaerobic toxin gene from *Clostridium bifermentans* subs. *malasya*, encoding a new mosquitocidal protein with homologies to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *J. Bacteriol.* 178:3099-3105.
3. **Bechtel D. B. y L. A. Bulla Jr.** 1976. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 127:1472-1481
4. **Belfiore, C.J., Vadlamudi, R.K., Osman, Y.A. y L.A. Jr. Bulla.** 1994. A specific binding protein from *Tenebrio molitor* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 359-364.
5. **Bosch, D., Schipper, B., Van der Kleij, H., de Maagd, R.A. y W.J. Stiekema** 1994. Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. *Bio/Technology* 12, 915-918.
6. **Blalock, J. E.** 1999. On the evolution of ligands: did peptides functionally precede metals and small organic molecules? *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 513-518.

7. **Bravo, A., K. Hendrickx, S. Jansens, and M. Peferoen.** 1992. Immunocytochemical Analysis of Specific Binding of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins to Lepidopteran and Coleopteran Midgut Membranes. *J. Invertebr. Pathol.* 60:247-254
8. **Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L., Villalobos, F. J., Peña, G., Nuñez-Valdez, M. E., Soberón, M., and Quintero, R.** 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 164, 4965-4972.
9. **Butko, P., Cournoyer, M., Puztai-Carey, M. y W.K. Surewick.** 1994. Membrane interactions and surface hidrofobicity of *Bacillus thuringiensis*  $\square$ -endotoxin CryIC. *FEBS Lett.* 340, 89-92.
10. **Caramori, T., Albertini, A.M. y A. Galizzi.** 1991. *In vivo* generation of hybrids between two *Bacillus thuringiensis* insect-toxin-encoding genes. *Gene* 98, 37-44.
11. **Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf. J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum y D.H. Dean.** 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Rev.* 62:807-813
12. **Dean, D.H., Rajamohan, F., Lee, M.K., Wu, S.-J., Chen, X.J., Alcántara, E. y S.R. Hussain** 1996. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis- a minireview. *Gene* 179, 111-117.
13. **De Maagd, R.A., Kwa, M.S.-G., Van der Klei, H., Yamamoto, T., Schipper, B., Vlak, J.M., Stiekema, W.J. y D. Bosch** 1996. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1537-1543.
14. **de Maagd, R. A., Bravo, A., Crickmore, N.** 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *TRENDS in Genetics.* 17, 193-198.
15. **Denolf P., K. Hendrickx, J. VanDamme, S. Jansens, M. Peferoen, D. Degheele y J. VanRie.** 1997. Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins *Eur. J. Biochem.* 248 (3) : 748-761
16. **Ebersold, H.R., Lüthy, P., Geiser, P. y L. Ettliger** 1978. The action of the  $\square$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: an electron microscope study. *Experientia* 34, 1672.
17. **English, L.H., Raddy, T.L. y A.E. Bastian.** 1991.  $\square$ -endotoxin induced leakage of  $^{86}\text{Rb-K}^+$  and  $\text{H}_2\text{O}$  from phospholipid vesicles is catalyzed by reconstituted midgut membrane. *Insect Biochem.* 21, 177-184.
18. **Estruch J. J., G.W. Warren, Mullins, G.J. Nye, J.A. Craig y M.G. Koziel.** 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5389-5394.
19. **Feitelson J. S., J. Payne y L. Kim.** 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/technology* 10:271-275
20. **Feitelson J.S.** 1993. The *Bacillus thuringiensis* family tree. p 63-71 En: L.Kim (ed) Advanced engineered pesticides. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

21. **Felsenstein J.** 1989. PHYLIP - Phylogeny inference package (version 2) *Cladistics* 5:164-166.
22. **Frutos, R., Rang, C., & Royer, M.** 1999. Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. *Crit. Rev. Biotechnol.* 19, 227-276.
23. **Garczynski, S.F., Crim, J.W. y M.J. Adang.** 1991. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin by protein blot analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2816-2820.
24. **Garczynski, S.F. y M.J. Adang.** 1995. *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c)  $\delta$ -endotoxin binding aminopeptidase in the *Manduca sexta* midgut has a glycosylphosphatidylinositol anchor. *Insec. Biochem. Molec. Biol.* 25, 409-415.
25. **Gill, S.S., Cowles, E.A. y V. Francis.** 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.
26. **Gómez, I., Oltean, D., Gill, S.S., Bravo, A. & Soberón, M.** 2001. Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. *J Biol Mol* 30, 28906-28912.
27. **Gomez, I., Miranda-Rios, J., Rudiño-Piñera, E., Oltean, D. I., Gill, S. S., Bravo, A., and Soberón, M.** 2002. Hydrophobic complementarity determines interaction of epitope <sup>869</sup>HITDTNNK<sup>876</sup> in *Manduca sexta* Bt-R<sub>1</sub> receptor with loop 2 of domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *J. Bio.l Chem.* 277, 30137-30143.
28. **Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A. & Soberón, M.** 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix  $\alpha$ -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* 513, 242-246.
29. **Gringorten, J.L., Milne, R.E., Fast, P.G., Sohi, S.S. y K. Van Frankenhuyzen.** 1992. Suppression of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin activity by low alkaline pH. *J. Invertebr. Pathol.* 60, 47-52.
30. **Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.L., Brousseau, R. y M. Cygler.** 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254, 447-464.
31. **Gupta, B.L., Dow, J.A.T., Hall, T.A. y W.R. Harvey.** 1985. Electron probe X-ray microanalysis of the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* crystal protein insecticide on ions and electrogenic K<sup>+</sup>-transporting epithelium of the larval midgut in the lepidopteran, *Manduca sexta* *in vitro*. *J. Cell Sci.* 74, 137-152.
32. **Haider, M.Z. y D.J. Ellar.** 1989. Functional mapping of an entomocidal  $\delta$ -endotoxin. Single aminoacid changes produced by site-directed mutagenesis influence toxicity and specificity on the protein. *J. Mol. Biol.* 208, 183-194.
33. **Haldenwang W.G.** 1995 The sigma factors of *Bacillus subtilis* *Microbiol Rev.* 59:1-30
34. **Helgason, E., Okstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I. and Kolsto, A-B.** 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*- One species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2627-2630.
35. **Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S. y H. Van Mellaert.** 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin is

- correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7844-7848.
36. **Höfte, H. y H. R. Whiteley.** 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.
  37. **Hussain, S.-R., Aronson, A.I. y D.H. Dean.** 1996. Substitution of residues on the proximal side of Cry1A *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins affects irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226, 8-14.
  38. **Indrasith, L.S. y H. Hori.** 1992. Isolation and partial characterization of binding proteins for immobilized delta endotoxin from solubilized brush border membrane vesicles of the silkworm, *Bombyx mori*, and the common cutworm, *Spodoptera litura*. *Comp. Biochem. Physiol.* 102 B, 605-610.
  39. **Knight, P.J.K., Crickmore, N. y D.J. Ellar.** 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIAc  $\delta$ -endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 11, 429-436.
  40. **Knowles, B.H. y D.J. Ellar.** 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 924, 509-518.
  41. **Knowles, B.H., Knight, P.J.K. y D.J. Ellar.** 1991. *N*-acetyl-D-galactosamine is part of the receptor in insect gut epithelia that recognizes an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 245, 31-35.
  42. **Knowles, B.H.** 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. *Advan. Insect Physiol.* 24, 275-308.
  43. **Lee, M.K., Young, B.A. y D.H. Dean.** 1995. Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 306-312.
  44. **Lee, M.K., You, T.H., Young, B.A., Cotrill, J.A., Valaitis, A.P. y D.H. Dean.** 1996. Aminopeptidase N purified from gypsy moth brush border membrane vesicles is a specific receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2845-2849.
  45. **Lee, M.K., You, T.H., Curtiss, A. y D.H. Dean.** 1996. Involvement of two amino acid residues in the loop region of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin in toxicity and binding to *Lymantria dispar*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 139-146.
  46. **Levinson B.L.** 1990. High-performance liquid chromatography analysis of two beta-exotoxins produced by some *Bacillus thuringiensis* strains. p 115-136. En : L.A. Hickie and W.L. Fitch (ed), Analytical chemistry of *Bacillus thuringiensis*. American Chemical Society, Washington, D.C.
  47. **Li, J., Carroll, J. y D.J. Ellar.** 1991. Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353, 815-821.
  48. **Li, J.** 1992. Bacterial toxins. *Curr. Opinion Struct. Biol.* 2, 545-556.
  49. **Jenkins J.L., M. K. Lee, A.P. Valaitis, A. Curtiss y D. H. Dean.** 2000 Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to Gypsy moth aminopeptidase N receptor. *J. Biol. Chem.* 275:14423-14431

50. **Lorence, A., Darszon, A., Díaz, C., Liévano, A., Quintero, R. y A. Bravo.** 1995. d-Endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* 360, 217-222.
51. **Lövgren A., M.-Y. Zhang, A. Engström, G. Dalhammar y R. Landén.** 1990. Molecular characterization of immune inhibitor A, a secreted virulence protease from *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 4:2137-2146.
52. **Lu, H., Rajamohan, F. y D.H. Dean.** 1994. Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin CryIAa associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. *J. Bacteriol.* 176, 5554-5559.
53. **Lu, Y.-J. y M.J. Adang.** 1996. Conversion of *Bacillus thuringiensis* CryIAC-binding aminopeptidase to a soluble form by endogenous phosphatidylinositol phospholipase C. *Insec. Biochem. Molec. Biol.* 26, 33-40.
54. **Luo, K., Lu, Y.J. y M.J. Adang.** 1996. A 106 kDa form of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIC  $\square$ -endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 26, 783-791.
55. **Luo, K., Tabashnik, B.E. y M.J. Adang.** 1997. Binding of *Bacillus thuringiensis* CryIAC toxin to aminopeptidase in susceptible and resistant diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1024-1027.
56. **Martens, J.W.M., Visser, B., Vlak, J.M. y D. Bosch.** 1995. Mapping and characterization of the entomocidal domain of the *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) protoxin. *Mol. Gen. Genet.* 247, 482-487.
57. **Masson, L., B. Tabashnik, Y.-B. Liu, R. Brusseau, and J.-L. Schwartz.** 1999. Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin lines the lumen of the ion channel. *J. Biol. Chem.* 274:31996-32000.
58. **Oddou, P., Hartmann, H. y M. Geiser.** 1991. Identification and characterization of *Heliothis virescens* midgut membrane proteins binding *Bacillus thuringiensis*  $\square$ -endotoxins. *Eur. J. Biochem.* 202, 676-680.
59. **Percy, J. y P.G. Fast.** 1983. *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. *J. Invertebr. Pathol.* 41, 86-98.
60. **Parker, M.W. y F. Pattus.** 1993. Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins. *TIBS* 18, 391-395.
61. **Pietrantonio, P.V. y S.S. Gill.** 1996. *Bacillus thuringiensis* endotoxins: action on the insect midgut. En "Biology of the Insect Midgut". Lehane, M.J. y P.F. Billingsley (eds.). Chapman & Hall, Londres, pp. 345-372.
62. **Powell, K.A.** In (ed. Jones, D.G.) Exploitation of microorganisms, pp. 441-459 (Chapman and Hall, London, 1993)
63. **Rajamohan, F., Alcantara, E., Lee, M.K., Chen, X.J., Curtiss, A. y D.H. Dean.** 1995. Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryIAb  $\square$ -endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 177, 2276-2282.
64. **Rajamohan, F., Alzate, O., Cotrill, J., Curtiss, A. y D.H. Dean.** 1996. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis*  $\square$ -endotoxin: mutations at domain II of CryIAb enhance receptor affinity and toxicity towards gypsy moth larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14338-14343.

65. **Sangadala, S., Walters, F.W., English, L.H. y M.J. Adang.** 1994. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and  $^{86}\text{Rb}^+$ - $\text{K}^+$  efflux *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 269, 10088-10092.
66. **Schnepf H.E., N. Crickmore, J. Van Rie, Dereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler y D.H. Dean.** 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
67. **Schnepf H.E. y Whiteley H.R.** 1985. **Protein toxins of *Bacilli*.** p. 209-216. **En: J.A. Hoch y P. Setlow** (ed) Molecular biology of microbial differentiation. American Society for Microbiology, Washintong D.C.
68. **Schwartz, J.L., Garneau, L., Masson, L., Brousseau, R. y E. Rousseau.** 1993. Lepidopteran-specific  $\beta$ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* 132, 53-62.
69. **Schwartz, J.L., Juteau, M., Grochulski, P., Cygler, M., Préfontaine, G., Brousseau, R. y L. Masson.** 1997. Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. *FEBS Lett.* 410, 397-402.
70. **Slatin, S.L., Abrams, C.K. y L. English.** 1990.  $\beta$ -Endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169, 765-772.
71. **Smedley, D.P. y D.J. Ellar.** 1996. Mutagenesis of three surface-exposed loops of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin reveals residues important for toxicity, receptor recognition and possibly membrane insertion. *Microbiology* 142, 1617-1624.
72. **Strizhov, N., Keller, M., Konez-Kálmán, Z., Regev, A., Sneh, B., Schell, J., Koncz, C. y A. Zilberstein.** 1996. Mapping of the entomocidal fragment of *Spodoptera*-specific *Bacillus thuringiensis* toxin CryIC. *Mol. Gen. Genet.* 253, 11-19.
73. **Thompson J.D., D.G. Higgins y T.J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W : improving the sensivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* 22:4673-4680.
74. **Thorne, C. B.** 1993. *Bacillus anthracis*, p.113-124. *In* A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
75. **Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, I., Ji, T.H. y L.A. Jr. Bulla.** 1995. Cloning and expresion of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270, 5490-5494.
76. **Valaitis, A.P., Lee, M.K., Rajamohan, F. y D.H. Dean.** 1995. Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for the CryIA(c)  $\beta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 25, 1143-1151.
77. **Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D. y H. Van Mellaert.** 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\beta$ -endotoxins. *Eur. J. Biochem.* 186, 239-247.
78. **Wabiko, H., Raymond, K.C. y A.L. Jr. Bulla.** 1986. *Bacillus thuringiensis* entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis. *DNA* 5, 305-314.

79. **Wu, D. y A.I. Aronson.** 1992. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis*  $\beta$ -endotoxin involved in toxicity and specificity. *J. Biol. Chem.* 267, 2311-2317.
80. **Wu, S.-J. y D.H. Dean.** 1996. Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIII A  $\beta$ -endotoxin. *J. Mol. Biol.* 255, 628-640.
81. **Yunovitz, H. y A. Yawetz.** 1988. Interaction between the  $\beta$ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* spp. *entomocidus* and liposomes. *FEBS Lett.* 230, 105-108.
82. **Zhang M.-Y., A. Lövgren, M.G. Low, y R. Landén.** 1993. Characterization of an avirulent pleiotropic mutant of the insect pathogen *Bacillus thuringiensis* : reduced expression of flagellin and phospholipases. *Infect. Immunol.* 61: 4947-4954.
83. **Zhuang, M. Oltean, D. I., Gómez, I., Pullikuth, A. K., Soberón, M., Bravo, A., and Gill. S. S.** 2001. *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.