

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM SAÚDE PÚBLICA

LÍGIA MARIA FERREIRA

MODO DE AÇÃO DO BIOLARVICIDA *Lysinibacillus sphaericus*:
IDENTIFICAÇÃO DO EPITOPO DA TOXINA BINÁRIA NO RECEPTOR
Cqm1 E BASE MOLECULAR DA SELETIVIDADE

RECIFE
2014

LÍGIA MARIA FERREIRA

**Modo de ação do biolarvicida *Lysinibacillus sphaericus*: identificação do epitopo da
toxina Binária no receptor Cqm1 e base
molecular da seletividade**

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado em Saúde Pública do
Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz,
para a obtenção do grau de doutor em
Ciências.

Orientadores: Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

**RECIFE
2014**

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- F383m Ferreira, Lígia Maria.
Modo de ação do biolarvicida *Lysinibacillus sphaericus*: identificação do epitopo da toxina Binária no receptor Cqm1 e base molecular da seletividade / Lígia Maria Ferreira. - Recife: s.n, 2014.
161 p. : tab.; ilus., 30 cm.
- Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2014.
Orientadora: Maria Helena Neves Lobo Silva Filha;
co-orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto.
1. Controle biológico de vetores. 2. Toxinas bacterianas - toxicidade. 3. *Culex* - ultraestrutura. 4. Receptores da superfície celular. I. Silva Filha, Maria Helena Neves Lobo. II. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de. III. Título.

LÍGIA MARIA FERREIRA

**Modo de ação do biolarvicida *Lysinibacillus sphaericus*: identificação do epitopo da
toxina Binária no receptor Cqm1 e base
molecular da seletividade**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de doutor em Ciências.

Data de aprovação: 14/03/2014

BANCA EXAMINADORA

Dra. Nilma Cintra Leal
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dr. Fernando Ariel Genta
Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ

Dr. Rafael Dhalia
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

Dr. Roberto Dias Lins Neto
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

*A todos que, de alguma forma, contribuíram
para a realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença em minha vida, iluminando os meus caminhos e indicando sempre as melhores direções.

A dona Odete, minha mãe e pai, por ter me acompanhado desde o início da minha vida acadêmica, não me abandonando um só momento e pela dedicação em exercer essa difícil tarefa.

Aos meus irmãos, Levi, Lívio e Lênio, por sempre acreditarem em mim, pelo apoio e força dados quando precisei, pelas comemorações a cada conquista, e pelos exemplos dados, pois isso sem dúvida fez toda a diferença.

A Adson pela companhia e apoio incondicionais, por estar sempre disposto a cada chamado, me ouvindo e me ajudando pacientemente a encontrar as melhores soluções. Por dividir comigo os momentos mais estressantes e me ajudar a manter o equilíbrio sempre.

À minha orientadora, Dra. Maria Helena, pela oportunidade de fazer parte da sua equipe e por desempenhar tão bem o papel de orientadora. Sem dúvida irei levar comigo os seus ensinamentos e segui-los na minha vida profissional.

Ao Dr. Osvaldo Pompílio, pela co-orientação e contribuição para o desenvolvimento do trabalho e por sempre ter uma solução pronta para cada situação.

À Dra. Tatiany Romão por também co-orientar este trabalho, ajudando no desenvolvimento dos experimentos e das estratégias de trabalho e ao Dr. Christian Reis, por sempre estar disposto a ajudar, pelas dúvidas esclarecidas e pelas idéias dadas sempre que precisei.

À bióloga Nathaly Nascimento pela dedicação na realização dos experimentos e por nunca ter se recusado a ajudar quando precisei.

À equipe do Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM pela contribuição com o sequenciamento das amostras de DNA utilizadas no estudo.

À equipe do setor de esterilização – Edson, Nelson e Rita – pelo fornecimento dos materiais necessários.

Aos atuais colegas do Departamento de Entomologia e aos que por ele passaram, pela contribuição com os experimentos no dia-a-dia e pelos momentos agradáveis durante o trabalho.

Aos amigos Diogo Chalegre, Eloína Santos, Elisama Helvécio, Iêda Oliveira, Liliane Amorim, Tatiane Alexandre, Nathaly Nascimento, com quem tive a oportunidade de conviver mais tempo, pelas conversas, conselhos e pela companhia nos trabalhos fora do horário do expediente.

Aos amigos do Departamento de Microbiologia, alguns antigos, outros com quem tive a oportunidade de conviver mais recentemente: Carol, Ludi, Marília, Rômulo, Rodrigo e Wagner, pela companhia e pelos cafezinhos no final do dia.

Às meninas, Ana Paula, Betânia, Bethânia, Maíra e Narjara, pelos onze anos de amizade verdadeira e pelos momentos de desabafo a cada encontro.

Aos amigos Mariana Nunes, Rodrigo Pontes e Veridiana Souza, que fazem parte de um grupo formado recentemente, mas que deu muito certo e que espero que perdure por muito tempo.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pela infra-estrutura e ao CNPq e FACEPE pelo apoio financeiro ao projeto.

Aos membros da banca pela valiosa contribuição na avaliação do trabalho.

A todos que, embora não citados, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*Resta essa faculdade incoercível de sonhar
De transfigurar a realidade, dentro dessa incapacidade
De aceitá-la tal como é, e essa visão
Ampla dos acontecimentos, e essa impressionante
E desnecessária presciência, e essa memória anterior
De mundos inexistentes, e esse heroísmo
Estático, e essa pequenina luz indecifrável
A que às vezes os poetas dão o nome de esperança.*

(Vinícius de Moraes)

FERREIRA, Lígia Maria. Modo de ação do biolarvicida *Lysinibacillus sphaericus*: identificação do epitopo da toxina Binária no receptor Cqm1 e base molecular da seletividade. 2014. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

RESUMO

A toxina Binária (Bin) é o principal fator tóxico da bactéria entomopatogena *Lysinibacillus sphaericus* e sua ação em *Culex quinquefasciatus* depende da ligação com receptores no intestino das larvas. Os receptores são as α -glicosidases Cqm1, localizadas no epitélio, ligadas por uma âncora de glicosil-fosfatidilinositol. Larvas de *Aedes aegypti* são refratárias à toxina, pois, não apresentam receptores funcionais, apesar de apresentarem um gene que codifica a proteína Aam1, com alta similaridade à Cqm1. Devido às lacunas a respeito do espectro de ação da toxina Bin, o objetivo deste estudo foi identificar epitopos de ligação da toxina no receptor Cqm1 e determinar a base molecular da sua ação para estas espécies de vetores. Os resultados obtidos a partir da análise comparativa das proteínas Cqm1 e Aam1 levaram à identificação de um epitopo da toxina Bin no receptor Cqm1, situado numa alça na região N-terminal S129-A312. Este epitopo é composto pelos aminoácidos $_{155}\text{PATGGG}_{160}$, não conservados em Aam1 ($_{158}\text{AETGKL}_{163}$), e os resíduos $_{159}\text{GG}_{160}$ são críticos para a ligação com a Bin. A análise da proteína ortóloga Aam1 demonstrou que esta é expressa em larvas de *Ae. aegypti*, semelhante à Cqm1, porém ela não é capaz de ligar-se à toxina Bin. Uma diferença marcante da proteína Aam1 é sua glicosilação, entretanto, a remoção de carboidratos da proteína não afetou o padrão de ligação à toxina Bin. A análise da Cqm1 mostrou que os glicanos não são necessários para a interação com a toxina Bin e que possivelmente esta proteína não parece ser glicosilada. O estudo mostrou que um pequeno segmento de resíduos da região da proteína Cqm1, com baixa conservação em Aam1, é crítica para a ligação da toxina Bin e sugere que esta poderia ser a causa da refratariedade das larvas de *Ae. aegypti*. Os resultados deste estudo são relevantes para elucidar a base molecular do modo de ação de *L. sphaericus* e abrem perspectivas para a busca de outros determinantes moleculares envolvidos neste processo.

Palavras-chave: Controle biológico de vetores, toxinas bacterianas, *Culex*, Receptores da superfície celular.

FERREIRA, Lígia Maria. Modo de ação do biolarvicida *Lysinibacillus sphaericus*: identificação do epitopo da toxina Binária no receptor Cqm1 e base molecular da seletividade. 2014. Thesis (Doctorate in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

ABSTRACT

The Bin toxin is the main toxic factor of the bacterium *Lysinibacillus sphaericus* whose action in *Culex quinquefasciatus* larvae depends on its binding to the midgut epithelial receptors. These receptors are the Cqm1 α -glucosidases that are expressed on insect midgut attached by a GPI anchor. *Aedes aegypti* is refractory to the Bin toxin because larvae do not have functional receptors on the midgut, despite of the presence of a gene that encodes the Aam1 protein, that is highly similar to Cqm1. In view of the lack of knowledge on the spectrum of action of the Bin toxin action, the goal of this study was to identify the Bin binding epitopes on Cqm1 receptor and to determine the molecular basis of its toxic action for these vectors species. Results obtained through a comparative analysis between Cqm1 and Aam1 led to identification of a Bin toxin epitope on Cqm1 receptor located in a loop at the N-terminus of the protein, between residues S129-A312. This epitope is composed by the residues ₁₅₅PATGGG₁₆₀, non-conserved in the Aam1 (₁₅₈AETGKL₁₆₃), and the residues ₁₅₉GG₁₆₀ are critical to Bin binding. The investigation of the Aam1 showed that this protein is expressed in *Ae. aegypti* larvae, similarly to Cqm1, however, it does not have binding ability to Bin. A marked difference in Aam1 is its glycosylation, however, removal of the carbohydrates from this protein had no effect on Bin toxin binding. Cqm1 analysis showed that glycans are not necessary to interaction with Bin and this protein does not seem to be glycosylated. The study showed a small segment of non-conserved residues between Cqm1 and Aam1 is critical for the Bin binding and data suggest that this could be the reason for refractoriness of *Ae. egypti* larvae to *L. sphaericus*. The results from this study are relevant to elucidate the molecular basis of the *L. sphaericus* mode of action and open prospects for the search of other molecular determinants that could be involved in this process.

Key-words: Biological control of vectors, bacterial toxins, *Culex*, Cell surface receptors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> .	21
Figura 2 - Micrografia eletrônica de <i>Lysinibacillus sphaericus</i> em fase de esporulação.	26
Figura 3 - Representação da interação do receptor Cqm1 de <i>Culex quinquefasciatus</i> com a subunidade BinB da toxina Bin.	29
Figura 4 - Alinhamento múltiplo no programa Clustal W das sequências de aminoácidos do receptor da toxina Bin do <i>Lysinibacillus sphaericus</i> em <i>Culex pipiens</i> (Cpm1) e seus ortólogos em <i>Culex quinquefasciatus</i> (Cqm1), <i>Anopheles gambiae</i> (Agm3) e <i>Aedes aegypti</i> (Aam1).	32
Figura 5 - Estrutura terciária de uma α -amilase (Taka-amilase A).	33
Quadro 1 - Análise comparativa entre <i>C. quinquefasciatus</i> , <i>An. gambiae</i> e <i>Ae. aegypti</i> .	39
Figura 6 - Etapas dos procedimentos experimentais.	42
Figura 7 - Especificidade da PNGase F.	48
Figura 8 - Tratamento das proteínas recombinantes Cqm1 e Aam1 com a endoglicosidase PNGase F.	62
Figura 9 - Perfil eletroforético das proteínas Aam1, Aam1_MutNET e Aam1_MutNRT produzidas em células Sf9.	63
Figura 10 - Ensaio de <i>pull-down</i> para avaliar a ligação das proteínas Cqm1, Aam1_MutNET e Aam1_MutNRT com a toxina BinB (BinB).	64
Figura 11 - Perfil eletroforético das proteínas Aam1 selvagem e Aam1_Mut2 produzidas em células Sf9.	65
Figura 12 - Ensaio de <i>pull-down</i> para avaliar a ligação das proteínas Cqm1 e Aam1_Mut2 com a toxina BinB (BinB).	65
Figura 13 - Perfil eletroforético das proteínas mutantes Cqm1 (Cqm1 mutante que apresenta o mesmo peso molecular da Cqm1 selvagem), Cqm1_MutNTN e Cqm1_MutNSK, produzida em células Sf9.	66
Figura 14 - Ensaio de <i>pull-down</i> para avaliar a ligação das proteínas Cqm1, Cqm1_MutNTN e Cqm1_MutNSK com a toxina BinB (BinB).	67
Figura 15 - Perfil hidropático dos aminoácidos de um spot pouco conservado entre Cqm1 e Aam1.	101

Figura 16 - Modelagem das proteínas Cqm1 selvagem (A, C) e mutante no sítio $_{155}\text{PATGGG}_{160}$.	103
Figura 17 - Modelagem das proteínas Aam1 selvagem (A, C) e mutante no sítio $_{154}\text{GRQNAETGKLD}_{164}$.	104
Figura 18 - Modelagem das proteínas Cqm1 e Aam1 selvagens e representação dos sítios de glicosilação.	105
Figura 19 - Modelagem das proteínas Cqm1 selvagem (A, C) e mutante com a região V393-Q458 deletada.	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Receptores de toxinas inseticidas de <i>Lysinibacillus sphaericus</i> (Lsp) e <i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar. <i>israelensis</i> (Bti) no epitélio intestinal de larvas de culicídeos.	38
Tabela 2 - Sítios potenciais de N-glicosilação das proteínas Cqm1 e Aam1, determinados através do programa NetNGly 1.0.	60
Tabela 3 - Sítios potenciais de fosforilação das proteínas Cqm1 e Aam1, determinados através do programa NetPhos 2.0.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aam1	<i>Aedes aegypti</i> maltase 1
Agm3	<i>Anopheles gambiae</i> maltase 3
ALP	Fosfatase alcalina
APN	Aminopeptidase-N
BB3	<i>Binding buffer</i> 3 – Tampão de ligação 3
BBMF	Frações de membrana de <i>microvilli</i> intestinal
Bin	Binária
B_{max}	Concentração de receptores
BSA	Albumina sérica bovina
Lsp	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> sorovar. <i>Israelenses</i>
CADR	Caderina
Cpm1	<i>Culex pipiens</i> maltase 1
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Cqm1	<i>Culex quinquefasciatus</i> maltase 1
CqSF	Colônia de <i>C. quinquefasciatus</i> sensível a Lsp
Cry	Toxina do cristal
Cyt	Toxina citolítica
DDT	Dicloro-difenil-tricloro-etano
DNA	Ácido desoxiribonucléico
cDNA	DNA complementar
dNTPs	Desoxinucleotídeos trifosfato
E.C.	Código enzimas dado pela <i>Enzime Comission</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> – Proteína Fluorescente Verde
GPI	Glicosilfosfatidil inositol
GS	Glutaciona sefarose
GST	Glutaciona S-tranferase
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico
Kd	Constante de dissociação
kDa	Kilodalton
Mtx	Toxina mosquitocida

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> - Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia
NP-40	Nonidet P40 [®]
NPT	Núcleo de plataformas tecnológicas
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – Tampão fosfato salina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase
PM	Peso molecular
RecL	Colônia de <i>Aedes aegypti</i> Recife
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	<i>Reverse-transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase utilizando a transcriptase reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
TA	Temperatura ambiente
TBE	<i>Tris – borate</i> – EDTA – Tris - ácido bórico – EDTA
TBS-T	<i>Tris buffered saline</i> - Tween 20 – Tampão Tris salina - Tween 20
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 Culicídeos	20
2.2 <i>Culex quinquefasciatus</i> Say 1823	21
2.3 <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus 1762	22
2.4 Controle de culicídeos	22
2.5 Bactérias entomopatógenas	24
2.6 <i>Lysinibacillus sphaericus</i> e suas toxinas inseticidas	24
2.7 A toxina Bin e seu modo de ação	26
2.7.1 Características	26
2.7.2 Modo de ação	27
2.7.3 Identificação de domínios funcionais	28
2.8 Receptores da toxina Bin	30
2.9 O receptor Cqm1 e a resistência à toxina Bin	33
2.10 Outros receptores de toxinas microbianas em dípteros	34
2.11 Papel das glicosilações na interação toxina-receptor	36
2.12 Espectro de ação da toxina Bin para larvas de <i>C. quinquefasciatus</i> e <i>Ae. aegypti</i>	37
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos	40
4 APRESENTAÇÃO DA TESE	41
5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	42
5.1 Colônias de insetos	42
5.2 Análises <i>in silico</i> de modificações pós-traducionais	43
5.3 Clonagem e expressão dos genes <i>cqm1</i> e <i>aam1</i>	43
5.3.1 Extração de RNA, RT-PCR e PCR	44
5.3.2 Clonagem e sequenciamento	44
5.3.3 Mutagênese sítio-dirigida em sítios de N-glicosilação	45
5.4 Produção de proteínas recombinantes em células Sf9	46
5.4.1 Transfecção de células Sf9	46

5.4.2 Análise da expressão de proteínas recombinantes	46
5.5 Padrão de glicosilações de proteínas	47
5.6 Ensaios de funcionalidade das proteínas Cqm1 e Aam1	49
6 ARTIGO 1 - The orthologue to the Cpm1/Cqm1 receptor in <i>Aedes aegypti</i> is expressed as a midgut GPI-anchored α-glucosidase, which does not bind to the insecticidal binary toxin	50
6.1 Apresentação e objetivos	50
6.2 Resultados complementares ao artigo 1	59
6.2.1 Análises <i>in silico</i> de modificações pós-traducionais	59
6.2.2 Padrão de glicosilação das proteínas recombinantes	62
6.2.3 Análise das proteínas Aam1 modificadas em sítios de N-glicosilação	62
6.2.4 Análise das proteínas Cqm1 modificadas em sítios de N-glicosilação	65
6.3 Sumário artigo 1 e resultados complementares	67
7 ARTIGO 2 - Non conserved residues between Cqm1 and Aam1 mosquito α-glucosidases are critical for the capacity of Cqm1 to bind the Binary (Bin) toxin from <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	69
7.1 Apresentação e objetivos	69
7.2 Resultados complementares ao artigo 2	100
7.2.1 Análise do perfil de hidropatia do epitopo de Cqm1	100
7.2.2 Modelagem das proteínas Cqm1 e Aam1	101
7.3 Sumário artigo 2 e resultados complementares	107
8 ARTIGO 3 - Bacterial larvicides for vector control: mode of action of toxins and implications for resistance	108
8.1 Apresentação	108
9 DISCUSSÃO	141
10 CONCLUSÕES	148
REFERÊNCIAS	149
APÊNDICE A – Artigo publicado em colaboração	160
ANEXO A – Considerações éticas	161

1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

As doenças transmitidas por vetores constituem, ainda hoje, importante causa de morbidade no Brasil e no Mundo (TAUIL, 2002) e correspondem a aproximadamente 17% das doenças infecciosas que afetam o planeta (TOWNSON et al., 2005). Culicídeos dos gêneros *Culex*, *Anopheles* e *Aedes* são vetores de patógenos e o seu controle populacional é de grande importância para interromper o ciclo de transmissão de doenças como filariose, malária e dengue, respectivamente. Apesar de sua relevância, a redução populacional de insetos vetores é um desafio para os programas de controle devido a características biológicas peculiares dos culicídeos, aliadas ao desordenamento urbano e outros fatores ambientais que propiciam o contato vetor-homem. Os programas de controle de vetores têm integrado diferentes estratégias capazes de reduzir a densidade de populações de vetores e, por conseguinte a transmissão de doenças, com o menor impacto negativo para o ambiente. Nesse contexto, o uso de larvicidas a base de bactérias entomopatógenas é uma ferramenta eficaz devido à sua ação inseticida seletiva para algumas espécies da ordem Diptera de importância na saúde pública, sendo inócuo para organismos não alvo (LACEY, 2007).

Os biolarvicidas à base das bactérias *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) e *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) têm sido utilizados com sucesso em programas de controle integrado de dípteros em várias regiões do mundo (CHARLES; NIELSON-LEROUX; DELECLUSE, 1996; LACEY, 2007; REGIS et al., 2001). *L. sphaericus* possui ação para diversas espécies de culicídeos dos gêneros *Culex*, *Anopheles* e *Aedes*, entretanto, *Aedes aegypti* é considerado refratário à toxina, pois as concentrações letais do Lsp para esta espécie são cerca de 100-1000 vezes mais elevadas do que aquelas utilizadas para larvas do complexo *Culex pipiens* (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992).

O principal fator tóxico de Lsp é a toxina Binária (Bin) produzida na forma de protoxina heterodimérica, no interior de um cristal protéico durante a esporulação bacteriana. A protoxina Bin é composta por polipeptídeos de 42- e 51- kDa denominados BinA e BinB, respectivamente (BAUMANN; BROADWELL; BAUMANN, 1988; CHARLES, 1987). As principais etapas do modo de ação de Lsp são: ingestão dos cristais; solubilização dos cristais em pH alcalino intestinal; ativação das protoxinas de 42- e 51- kDa em toxinas de 43- e 39- kDa, respectivamente, pela ação de serina-proteases intestinais. Após o processamento, as toxinas ativas interagem com receptores específicos no epitélio intestinal das larvas susceptíveis e promovem o efeito letal (BAUMANN et al., 1985; BROADWELL; BAUMANN, 1987; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992). Após o tratamento de larvas de

Culex com Lsp, podem ser visualizados efeitos citopatológicos nas células intestinais, dentre eles danos nas microvilosidades, intumescimento das cristas mitocondriais, fragmentação do retículo endoplasmático e vacuolização citoplasmática (CHARLES, 1987; DE MELO et al., 2008; SILVA-FILHA; PEIXOTO, 2003; SINGH; GILL, 1988).

Os receptores da toxina Bin em *C. quinquefasciatus*, *C. pipiens* e *An. gambiae* são as α -glicosidases (E.C. 3.2.1.20) “*C. quinquefasciatus* maltase” 1 (Cqm1), “*C. pipiens* maltase” 1 (Cpm1) e “*Anopheles gambiae* maltase” 1 (Agm3), respectivamente, com cerca de 580 aminoácidos e 60 kDa, ligadas ao epitélio intestinal por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (DARBOUX et al., 2001; OPOTA et al., 2008; PAUCHET et al., 2005; ROMÃO et al., 2006; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1999). Este grupo de α -glicosidases é bastante conservado em dípteros e a seqüência do receptor Cqm1 apresentou similaridade de 98 e 78 % com as α -glicosidases Cpm1 e Agm3, respectivamente (ROMÃO et al., 2006). Em *Ae. aegypti*, também foi identificada uma α -glicosidase ortóloga ao receptor Cqm1, denominada “*Ae. aegypti* maltase” 1 (Aam1) e que apresenta 83% de similaridade, apesar da refratariedade dessa espécie à toxina Bin (ROMÃO et al., 2006). Dados prévios demonstram, inclusive, que não ocorre ligação da toxina Bin ao epitélio intestinal das larvas (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992).

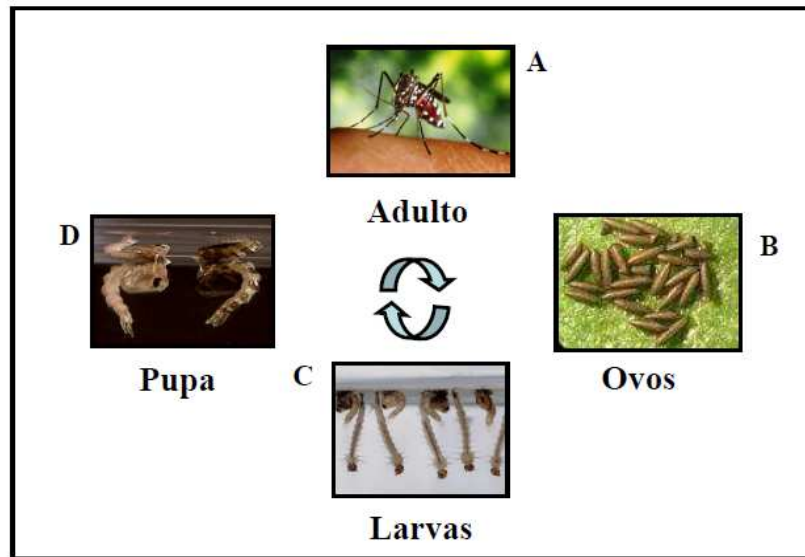
A identificação da proteína ortóloga Aam1 abriu perspectivas para a investigação das características dessa molécula, em comparação com a Cqm1, com o objetivo de identificar epitopos de ligação à toxina Bin na Cqm1, que é uma importante lacuna no conhecimento do modo de ação da toxina Bin. Além disso, será possível investigar os mecanismos que determinam a refratariedade do *Ae. aegypti* à toxina Bin. Diferenças de características e padrões de expressão destas proteínas ortólogas podem determinar o perfil de susceptibilidade à toxina Bin nas larvas dessas espécies. Para determinar os fatores envolvidos nas diferenças de susceptibilidade entre *C. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti* à toxina Bin é importante determinar se a proteína Aam1 está sendo expressa na fase larvária, se está em concentrações suficientes para a ligação com a toxina, se está localizada no epitélio intestinal e se é capaz de interagir com a toxina Bin. Além disso, é importante avaliar se modificações pós-traducionais, como as glicosilações, podem interferir na capacidade de ligação das proteínas, visto que esta é uma diferença marcante entre Cqm1 e Aam1. A refratariedade de *Ae. aegypti* pode ainda ser decorrente da perda de epitopos conformacionais da Aam1 ou ainda, da necessidade de atuação de proteínas acessórias para a ligação à toxina Bin que estejam ausentes nessa espécie. Espera-se neste estudo, considerando o contexto de hipóteses, identificar o epitopo de

ligação da toxina Bin no receptor Cqm1 e investigar a razão da refrataridade de *Ae. aegypti* à toxina Bin, a partir da caracterização da proteína Aam1.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Culicídeos

Os culicídeos são insetos que pertencem à ordem Diptera e podem transmitir agentes etiológicos de doenças ao homem como nematódeos, protozoários ou vírus de grande relevância na saúde pública. Espécies dos gêneros *Culex*, *Anopheles* e *Aedes* são vetores destes agentes, sendo, por isso, alvos de programas de controle que visam a redução de sua densidade populacional. Os culicídeos são holometábolos e apresentam um ciclo de vida curto que compreende as fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto (Figura 1). A fase pré-imaginal ocorre no ambiente aquático, e os adultos alados colonizam o ambiente terrestre. O ciclo de vida dura cerca de dez dias, desde o ovo até a emergência do adulto, entretanto, fatores como nutrição, temperatura, fotoperíodo e umidade podem causar variações nesse tempo. As fêmeas são hematófagas e a alimentação sanguínea é necessária para o completo desenvolvimento dos ovos, enquanto os machos se alimentam de seiva vegetal. Após o desenvolvimento embrionário, as larvas do 1º estágio (L₁) eclodem e passam por mais três estádios larvais (L₂, L₃ e L₄) até chegarem à fase de pupa. A partir da pupa ocorre a emergência da forma adulta e as fêmeas podem realizar de quatro a cinco ciclos gonadotróficos durante a vida. Devido ao hábito hematofágico das fêmeas, os mosquitos são capazes de adquirir agentes etiológicos de doenças e transmiti-los de um hospedeiro vertebrado para outro (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Figura 1 - Ciclo de vida de *Aedes aegypti*.

Fonte: Ferreira (2009)

Nota: Após o repasto sanguíneo as fêmeas (A) depositam os ovos (B) na superfície da água. Estes eclodem e liberam as larvas (C), que em seguida evoluem para a fase de pupa (D), a partir da qual emergem os adultos.

2.2 *Culex quinquefasciatus* Say 1823

Culex quinquefasciatus é uma espécie que pertence ao complexo *Culex pipiens* e apresenta distribuição cosmopolita. Possui ampla diversidade de criadouros, mas as fêmeas depositam seus ovos preferencialmente em criadouros artificiais com água rica em matéria orgânica e detritos tais como os sistemas de esgoto, fossas e valetas (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). É um mosquito altamente antropofílico e endofílico e é a espécie predominante em áreas urbanas, sendo encontrado em maior abundância nos meses quentes e chuvosos. As fêmeas realizam repasto sanguíneo preferencialmente no período crepuscular ou noturno e depositam seu ovos agrupados em forma de jangada. Esta espécie pode transmitir doenças como a filariose linfática, causada pelo nematódeo *Wuchereria bancrofti*, e que é considerada uma importante doença transmitida por vetores. Estima-se que cerca de 120 milhões de pessoas estejam infectadas pelo parasita e que cerca de 1,4 bilhões se encontrem sob risco em 73 países (CHANDY et al., 2011). A ampla distribuição da doença está associada às condições precárias de saneamento e ao crescimento desordenado da população, que favorecem a proliferação do vetor. Além da filariose, *C. quinquefasciatus* também pode ser vetor primário de alguns arbovírus de grande importância na saúde pública como o vírus do Nilo ocidental, Oropouche e Saint Louis (FIGUEIREDO, 2007; GODSEY et al., 2005;

MONDINI et al., 2007). É importante ressaltar que *C. quinquefasciatus* é o vetor da filariose linfática na Região Metropolitana do Recife, que ainda é endêmica para esta enfermidade. Desde 2003, é realizado um programa para o controle desta doença pela Secretaria de Saúde da cidade do Recife, visando a sua eliminação, de acordo com as diretrizes do Plano Global de Erradicação da Filariose, apoiado pela Organização Mundial de Saúde.

2.3 *Aedes aegypti* Linnaeus 1762

Aedes aegypti é principalmente encontrado em regiões tropicais e subtropicais das Américas, África e Ásia (SCHAFFNER; MEDLOCK; VAN BORTEL, 2013). Foi considerado erradicado da maior parte das Américas do Sul e Central por volta da década de 70, mas foi reintroduzido nestas regiões (Organização Mundial de Saúde, 2007). Esta espécie está presente predominantemente em áreas urbanas, geralmente no domicílio ou peridomicílio humano, e seus criadouros preferenciais são recipientes artificiais, com água pobre em matéria orgânica. Essa predileção pelo ambiente domiciliar facilita o contato com o homem, o que é necessário para que as fêmeas realizem a hematofagia, que ocorre preferencialmente no período diurno. A estratégia de oviposição de *Ae. aegypti* é diferente daquela adotada por *C. quinquefasciatus*, pois em cada postura as fêmeas depositam os ovos individuais em diversos criadouros, o que favorece sua dispersão no ambiente (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). O hábito hematofágico é uma característica que, assim como para outras espécies de culicídeos, favorece a transmissão de patógenos causadores de doenças. Além disso, *Ae. aegypti* é capaz de realizar o repasto sanguíneo em múltiplas pessoas em um único ciclo gonadotrófico, o que amplifica o seu papel como vetor (Organização Mundial de Saúde, 2013). *Ae. aegypti* é o vetor primário do vírus da dengue no Brasil e em diversos países e é também capaz de disseminar e transmitir o vírus da febre amarela no ciclo urbano da doença (MUTEBI et al., 2004). Recentemente esta espécie tem assumido o papel de vetor do vírus chikungunya em áreas endêmicas da África e da Ásia (ZAYED et al., 2012).

2.4 Controle de culicídeos

A maioria das doenças transmitidas por vetores não apresenta vacinas disponíveis para a sua profilaxia, bem como medicamentos eficazes para o tratamento. Por esta razão, o controle populacional de vetores é uma ação efetiva para interromper o ciclo de transmissão. Os culicídeos são organismos *r*-estrategistas e apresentam características biológicas como

elevada taxa reprodutiva, curto ciclo biológico e capacidade de colonizar habitats temporários, o que torna a sua redução populacional um desafio. O controle de vetores pode ser realizado por diversas abordagens, que podem incluir métodos de controle mecânico, uso de agentes químicos e biológicos, além de abordagens de controle genético.

As abordagens de controle genético de mosquitos envolvem desde a técnica de liberação em massa de machos estéreis até a liberação de insetos transgênicos com genes letais para o seu desenvolvimento, ou genes que impedem a transmissão de patógenos pelos insetos. Em alguns casos é realizada a introdução de genes letais dominantes que quando transmitidos para a progênie são expressos, impedindo seu desenvolvimento. Em outros, a modificação genética do mosquito leva à expressão de moléculas efetoras no intestino que inibem o desenvolvimento do parasita (SEIRIN LEE et al., 2013; WANG; JACOBS-LORENA, 2013; WILKE; MARRELLI, 2012).

O controle químico vem sendo utilizado desde a descoberta dos inseticidas sintéticos de ação residual, na década de 40 e é o principal método utilizado até hoje. Diversas classes de inseticidas tornaram-se disponíveis e as principais são os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. Entretanto, por atuarem em sítios-alvo presentes em várias espécies de organismos, apresentam como limitação o mecanismo de ação inespecífico e a ação em organismos não-alvo. Além disso, a seleção de populações de insetos resistentes, decorrentes do uso prolongado desses inseticidas, tem indicado a necessidade de substituição por outros agentes (HEMINGWAY; RANSON, 2000).

As limitações encontradas com os métodos de controle químico motivaram a busca por métodos de controle mais seletivos e o controle biológico tornou-se uma alternativa eficaz, visto que utiliza inseticidas com ação restrita a determinadas espécies, apresenta segurança para o meio ambiente e baixo custo de aplicação (MITTAL, 2003). Os métodos de controle biológico baseiam-se na utilização de organismos vivos, que podem ser parasitas, predadores ou competidores, bem como suas toxinas para reduzir a densidade populacional dos insetos. Dentre eles, as bactérias entomopatógenas são consideradas os agentes de controle biológico mais amplamente utilizados em programas de controle de insetos, desde a década de 60, e hoje representam cerca de 90% do mercado atual de biolarvicidas (REGIS et al., 2001).

2. 5 Bactérias entomopatógenas

Os larvicidas à base de bactérias entomopatógenas do gênero *Bacillus* e *Lysinibacillus* são importantes agentes de controle, pois possuem características como modo de ação específico, segurança para o meio ambiente e facilidade de produção em larga escala, que favoreceram a utilização em programas de controle (BRAVO et al., 2011). *Bacillus thuringiensis* (Bt) e *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) são bacilos Gram-positivos utilizados em preparações comerciais de biolarvicidas e são eficazes para o controle de insetos de diferentes ordens, sendo utilizados em vários países, inclusive no Brasil (MITTAL, 2003; REGIS et al., 2001; THIERY et al., 1996). Essas bactérias são cosmopolitas saprófitas de solos e ambientes aquáticos, sendo capazes de produzir esporos quando submetidas a condições adversas. Lsp possui ação tóxica para dípteros, em especial para culicídeos, enquanto que Bt possui mais de 70 sorovariedades que possuem atividade para diferentes ordens de insetos (Diptera, Lepidoptera, Coleoptera) e alguns nematódeos (CRICKMORE, 2014). Durante a fase de esporulação, essas bactérias produzem cristais protéicos que contém protoxinas com elevado poder inseticida, de caráter seletivo para alguns gêneros de insetos. O modo geral de ação de Bt e Lsp é semelhante e compreende as seguintes etapas: ingestão dos cristais pelas larvas; solubilização dos cristais em pH alcalino no lúmen intestinal, liberando as protoxinas; ativação das protoxinas em toxinas por serina-proteases intestinais; ligação das toxinas ativas com receptores específicos presentes no epitélio intestinal; efeitos citopatológicos nas células epiteliais intestinais que culminam com a morte das larvas. A etapa de ligação aos receptores é primordial no modo de ação desses agentes de controle, além de ser responsável pela seletividade das toxinas (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; VAN RIE et al., 1990). As preparações comerciais de biolarvicidas contêm como principal componente ativo os cristais contendo as protoxinas. O modo de ação de bactérias entomopatógenas tem sido alvo de revisões recentes, que mostram suas características, bem como aplicações para o controle de insetos praga e vetores (LACEY, 2007; PARDO-LOPEZ; SOBERON; BRAVO, 2013; PIGOTT; ELLAR, 2007).

2.6 *Lysinibacillus sphaericus* e suas toxinas inseticidas

A bactéria entomopatógena *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp), inicialmente denominada *Bacillus sphaericus*, produz esporos com formato esférico no interior de um esporângio em forma de raquete (Figura 2). Posteriormente, recebeu a nomenclatura de *Lysinibacillus*

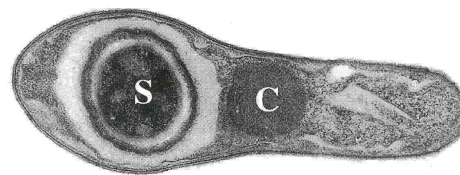
sphaericus por diferir dos outros membros do grupo *Bacillus* pela presença de lisina e aspartato no peptidoglicano da parede celular (AHMED et al., 2007). Devido a essa recente modificação, a literatura ainda refere-se a este organismo usando ambas as nomenclaturas. Lsp apresenta atividade restrita para larvas de culicídeos, sobretudo dos gêneros *Culex*, *Anopheles*, *Aedes*, *Psorophora* e *Mansonia*. A primeira linhagem de Lsp com atividade para larvas de mosquitos foi identificada em larvas de *Culiseta incidens* (KELLEN et al., 1965). Posteriormente, linhagens com elevada ação larvicida foram isoladas e as mais importantes são a 1593 da Indonésia (SINGER, 1977), 2297 do Sri Lanka (WICKREMESINGHE; MENDIS, 1980), 2362 da Nigéria (WEISER, 1984) e C3-41 da China (ZHANG et al., 1987). A descoberta destas linhagens levou ao desenvolvimento de biolarvicidas comerciais à base dessa bactéria e, devido ao seu potencial para controle de mosquitos, muitos isolados foram caracterizados e podem ser agrupados em 49 sorotipos, baseados no antígeno flagelar H. Análises baseadas em homologia de DNA classificaram os isolados em cinco grupos (I-V) e, destes, nove sorotipos do grupo IIA compreendem as linhagens com atividade larvicida elevada (ALEXANDER; PRIEST, 1990). Dos 9 sorotipos, o mais importante é o H5a5b, que agrupa as cepas com alto poder larvicida, tais como 1593, 2362 e C3-41 (KARCH; CHARLES, 1987).

Lsp produz três classes de toxinas que apresentam atividade larvicida para culicídeos, mediante ingestão e ação no epitélio intestinal das larvas. A toxina Binária (Bin) é o principal e primeiro fator inseticida identificado nas cepas de elevada atividade. Todos os biolarvicidas produzidos a base de Lsp possuem esta toxina como principal ingrediente ativo. Ela é produzida na fase de esporulação, sob a forma de cristais, e suas características serão descritas na seção seguinte. As toxinas mosquitocidas (Mtx), são classificadas em Mtx1 (100 kDa), Mtx2 (31 kDa) e Mtx3 (36 kDa) (LIU et al., 1996; THANABALU; PORTER, 1995, 1996) e foram primeiramente identificadas na linhagem SSII-1 do Lsp, que apresenta baixa toxicidade (SINGER, 1977). Tais toxinas não apresentam uma contribuição significativa para a atividade larvicida de culturas esporuladas de Lsp, pois são secretadas na fase vegetativa e degradadas por proteases (CHARLES et al., 1996; THANABALU; PORTER, 1995). Entretanto, quando expressas sob a forma recombinante em *Escherichia coli*, as toxinas Mtx possuem ação tóxica elevada para larvas de algumas espécies de dípteros (PARTRIDGE; BERRY, 2002; WEI; CAI; YUAN, 2006). Estudos sobre o modo de ação destas toxinas são escassos e os seus receptores ainda não foram caracterizados.

Uma nova toxina caracterizada recentemente na cepa IAB59 foi denominada Cry48Aa/Cry49Aa e também é produzida durante a esporulação, sob a forma de cristais. A

toxina Cry48Aa/Cry49Aa também é uma toxina binária, pois apresenta alta toxicidade para *C. quinquefasciatus*, apenas quando ambas as subunidades Cry48Aa e Cry49Aa são administradas em concentrações equimolares. Os componentes individuais não apresentam atividade significativa. Entretanto, as cepas nativas que expressam essa toxina não possuem atividade elevada, pois elas apresentam um baixo nível de expressão e acúmulo da Cry48Aa, o que impede a obtenção da toxicidade máxima, que só ocorre em razão equimolar (JONES et al., 2007; JONES et al., 2008). A grande maioria das toxinas Cry caracterizadas até o presente são produzidas por sorovarietades de *B. thuringiensis* (CRICKMORE, 2014). Esta se trata da primeira ocorrência de uma toxina Cry em uma cepa de *L. sphaericus* (BRAVO; GILL; SOBERON, 2007; DE MELO et al., 2008, 2009; JONES et al., 2007, 2008). O espectro de ação da Cry48A/Cry49Aa parece ser limitado para larvas de *Culex pipiens* (JONES et al., 2008) e estudos preliminares do modo de ação dessa toxina indicam que ela atua em receptores diferentes da toxina Bin (DE MELO et al., 2009; JONES et al., 2008).

Figura 2 - Micrografia eletrônica de *Lysinibacillus sphaericus* em fase de esporulação.



Fonte: Adaptado de Kalfon et al. (1984).

Nota: S. esporo. C. cristal protéico que possui ação larvicida para dípteros

2.7 A toxina Bin e seu modo de ação

2.7.1 Características

Como descrito, a toxina binária (Bin) é o principal fator tóxico do Lsp e também o princípio ativo de todos os produtos comerciais à base dessa bactéria. Os estudos do modo de ação de Lsp estão focados no mecanismo de ação desta toxina, que é um heterodímero composto por dois polipeptídeos de 42 e 51 kDa, denominados BinA e BinB, respectivamente, produzidos no interior de um cristal protéico durante a esporulação bacteriana. As duas subunidades são requeridas em quantidades equimolares para a obtenção da toxicidade máxima sendo, por isso, considerada uma toxina binária (CHARLES;

NIELSEN-LEROUX; DELECLUSE, 1996; NICOLAS et al., 1993). Os genes que codificam as subunidades estão localizados no cromossomo bacteriano e as sequências das proteínas BinA e BinB alinhadas possuem 25% de identidade e 40% de similaridade (CHARLES; NIELSEN-LEROUX; DELECLUSE, 1996). Além da baixa conservação entre si, essas toxinas inseticidas não possuem similaridade com nenhuma outra toxina já descrita, incluindo as toxinas Cry do Bt. A sua estrutura ainda não é conhecida e, por essa razão, seus domínios funcionais têm sido investigados através das diferentes abordagens, como será descrito no item 2.7.3.

2.7.2 Modo de ação

A atividade inseticida da toxina Bin é decrescente para larvas dos gêneros *Culex*, *Anopheles* e *Aedes*. Apesar de apresentar atividade para algumas espécies do gênero *Aedes*, como *Aedes atropalpus*, as larvas de *Ae. aegypti* são consideradas refratárias à toxina Bin, pois requerem concentrações letais cerca de 100-1000 vezes mais elevadas do que aquelas utilizadas para larvas do complexo *Culex pipiens* (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992). Após a ingestão dos cristais protéicos pelas larvas, estes são solubilizados em pH alcalino intestinal, a protoxina Bin é liberada no lúmen intestinal e ativada por serina-proteases intestinais que clivam os componentes BinA e BinB para a sua forma ativa, constituída por polipeptídeos de 39- e 43-kDa, respectivamente (BAUMANN et al., 1985; BROADWELL; BAUMANN, 1987). Após a ativação, a toxina Bin interage com receptores específicos no epitélio intestinal, conforme será descrito no item 2.8.

A ação tóxica do Lsp em espécies susceptíveis de culicídeos é determinada pela ligação específica da toxina Bin a uma única classe de receptores, localizados no epitélio intestinal de larvas dos gêneros *Culex* e *Anopheles* (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1997). A ligação específica da toxina Bin a receptores presentes no *microvilli* intestinal já foi demonstrada em larvas de *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* e *Anopheles gambiae* (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; OPOTA et al., 2008; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1997; SILVA-FILHA et al., 2004; SILVA-FILHA et al., 2008). Do ponto de vista qualitativo, em larvas do complexo *Culex pipiens* a toxina Bin se liga aos receptores intestinais, de forma regionalizada, no ceco gástrico e intestino posterior, em *Anopheles* a ligação ocorre de forma mais difusa ao longo do intestino, enquanto que um padrão de ligação específico é praticamente inexistente em *Ae. aegypti* (DAVIDSON, 1989). Ensaios de ligação *in vitro*

demonstraram que a afinidade de ligação da toxina aos receptores e a concentração destes no *microvilli* intestinal estão diretamente relacionadas à susceptibilidade *in vivo* das larvas. Em espécies do complexo *Culex pipiens*, que são altamente susceptíveis, os receptores são abundantes e a ligação é de alta afinidade e em espécies menos susceptíveis do gênero *Anopheles* a concentração de receptores e a afinidade de ligação são inferiores (SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1997). Em larvas de *Ae. aegypti*, espécie naturalmente refratária a Lsp, não é possível detectar uma ligação significativa da toxina ao epitélio intestinal (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992).

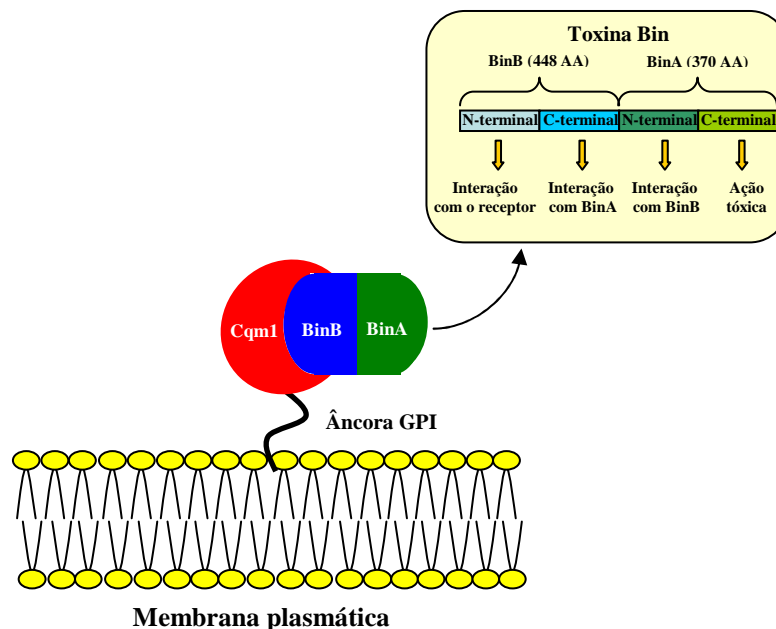
Após a etapa de ligação com o receptor, o modo de ação ainda não foi completamente elucidado, apesar dos efeitos citopatológicos causados pela toxina Bin já terem sido claramente descritos na literatura. Após o tratamento com o Lsp, a toxina Bin ocasiona a produção de efeitos citopatológicos nas células intestinais e os principais deles são danos nas microvilosidades, intumescimento das cristas mitocondriais, fragmentação do retículo endoplasmático e vacuolização citoplasmática (CHARLES, 1987; DE MELO et al., 2008; SILVA-FILHA; PEIXOTO, 2003; SINGH; GILL, 1988). Singh e Gill (1988) também mostraram danos em tecidos neurais e musculares. Estudos recentes demonstraram que após a ligação da toxina Bin ao receptor em *Culex pipiens*, o complexo toxina-receptor é internalizado por endocitose e induz um processo de autofagia nas células (OPOTA et al., 2011). Os vacúolos citoplasmáticos estão diretamente relacionados a este processo, pois servem como compartimento de degradação. Paralelamente também foi detectado que após a endocitose a toxina é direcionada para outros compartimentos, onde pode ser reciclada. Apesar desses achados, a causa da morte das larvas associada à ação da toxina Bin ainda não foi completamente elucidada.

2.7.3 Identificação de domínios funcionais

A função do componente BinB é reconhecer e ligar-se especificamente aos receptores no epitélio intestinal, determinando a especificidade da toxina (NICOLAS et al., 1993). Esta ligação com o receptor se dá através da região N-terminal da proteína, enquanto a região C-terminal está envolvida na interação com a BinA (ELANGOVA et al., 2000; OEI; HINDLEY; BERRY, 1992; ROMAO; DE-MELO-NETO; SILVA-FILHA, 2011). O componente BinB interage com o receptor Cqm1 através de uma região compreendida entre os aminoácidos 33 e 158 da toxina, através dos motivos $_{85}\text{IRF}_{87}$ e $_{147}\text{FQF}_{149}$ (ROMAO; DE-MELO-NETO; SILVA-FILHA, 2011). A subunidade BinA, através da sua porção C-terminal

é responsável pela toxicidade às células (NICOLAS et al., 1993) e ambas as regiões N- e C-terminal estão envolvidas na interação com o componente BinB (Figura 3) (ELANGO VAN et al., 2000; LIMPANAWAT; PROMDONKOY; BOONSERM, 2009; OEI; HINDLEY; BERRY, 1992; SANITT; PROMDONKOY; BOONSERM, 2008). Estudos demonstraram que os resíduos W222 e W226 do componente BinA são críticos para a atividade larvicida, entretanto, esses aminoácidos não parecem estar relacionados à interação entre os componentes BinA e BinB (KUNTHIC et al., 2011). Observou-se que, quando em solução, os componentes BinA e BinB são capazes de formar uma estrutura oligomérica que potencialmente interage como os receptores específicos (SRISUCHARITPANIT et al., 2012). Tal fato foi corroborado pelos achados de que os componentes BinA e BinB, quando ligados covalentemente, foram mais tóxicos que a mistura equimolar dos componentes ativos (KALE et al., 2013). Outros estudos também demonstram que a interação da Bin com as membranas celulares leva a modificações conformacionais, que são obtidas exclusivamente na presença de ambas as subunidades (BOONSERM et al., 2006).

Figura 3 - Representação da interação do receptor Cqm1 de *Culex quinquefasciatus* com a subunidade BinB da toxina Bin.



Fonte: Elaborada pela autora

2.8 Receptores da toxina Bin

Os receptores da toxina Bin foram caracterizados em larvas de *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus* e *An. gambiae* e são α -glicosidases (E.C. 3.2.1.20) localizadas no epitélio intestinal, ligadas através de uma âncora de glicosil-fosfatidilinositol (GPI). Estas proteínas foram denominadas “*C. pipiens* maltase” 1 (Cpm1), “*C. quinquefasciatus* maltase” 1 (Cqm1) e “*An. gambiae* maltase” 3 (Agm3), respectivamente. (DARBOUX et al., 2001; OPOTA et al., 2008; PAUCHET et al., 2005; ROMÃO et al., 2006; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1999).

A primeira sequência descrita foi do gene *cpm1* de *C. pipiens* e este gene apresenta 1871 nt e uma “*open reading frame*” (ORF) de 1743 nt, que codifica uma proteína com 580 aminoácidos e peso molecular predito aproximado de 61 kDa. A proteína Cpm1 apresenta três sítios preditos de N-glicosilação e aminoácidos que sinalizam uma sequência sinal e a inserção de uma âncora GPI (DARBOUX et al., 2001). Além disso, apresenta quatro sítios catalíticos, característicos das α -glicosidases, que são conservados entre os receptores (Figura 4).

A sequência completa do gene *cqm1*, obtida de *C. quinquefasciatus*, possui o mesmo número de nucleotídeos e organização do gene *cpm1* e está disponível no GenBank, sob o número de acesso DQ333335 (Figura 4). A proteína Cqm1 apresenta as mesmas características da proteína Cpm1 (ROMÃO et al., 2006).

O gene *agm3* de *An. gambiae* apresenta uma ORF de 1767 nt, que codifica a proteína Agm3, que apresenta 588 aminoácidos e um peso molecular predito aproximado de 67 kDa. Esta proteína também apresenta um peptídeo sinal na porção N-terminal, os aminoácidos que sinalizam uma âncora GPI e três sítios de N-glicosilação. A Agm3 apresenta uma distribuição no epitélio intestinal das larvas predominantemente nas células do intestino posterior (OPOTA et al., 2008).

As α -glicosidases desempenham um importante papel fisiológico na digestão de carboidratos, pois são responsáveis pela hidrólise de ligações α -1-4 entre resíduos de glicose (KRAZIKOV; KARELOV; FIRSOV, 2001; TERRA; FERREIRA, 1994). As proteínas Cqm1, Cpm1 e Agm3 apresentam quatro sítios catalíticos responsáveis pela sua atividade enzimática, entretanto, os epítomos de ligação à toxina Bin e as respectivas estruturas não são conhecidos. As α -glicosidases de diversos organismos apresentam regiões conservadas na sua estrutura primária e dois domínios estruturais que compõem a estrutura terciária. O domínio A

possui uma organização composta por uma sequência de oito folhas β e oito α -hélices, conhecida como $(\beta/\alpha)_8$ barril, enquanto o domínio B possui folhas β antiparalelas que compõem uma estrutura chamada β -sanduíche (Figura 5) (KRAZIKOV; KARELOV; FIRSOV, 2001). No presente estudo, foi feita uma análise de modelagem para as proteínas Cqm1 e Aam1, devido à ausência de dados estruturais destas α -glicosidases.

Em *Aedes aegypti*, também foi identificado um gene que codifica uma proteína ortóloga (“*Ae. aegypti* maltase” 1 – Aam1) com 83% de similaridade em relação à Cqm1 nas análises de sequências deduzidas (Figura 4). O gene *aam1* apresenta uma ORF de 1749 nt, que codifica uma proteína de 582 aminoácidos, peso predito de 67 kDa e sinalização para a inserção no epitélio, também através de uma âncora GPI. Os dados prévios demonstram que não ocorre ligação da toxina Bin ao epitélio intestinal das larvas (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992) e, por esta razão, a identificação desse gene ortólogo possibilita a investigação das características da proteína Aam1 em relação à Cqm1. Esta análise comparativa será utilizada para a identificação dos epitopos de ligação à toxina Bin na Cqm1 e a investigação dos mecanismos que determinam a refratariedade do *Ae. aegypti* à toxina Bin.

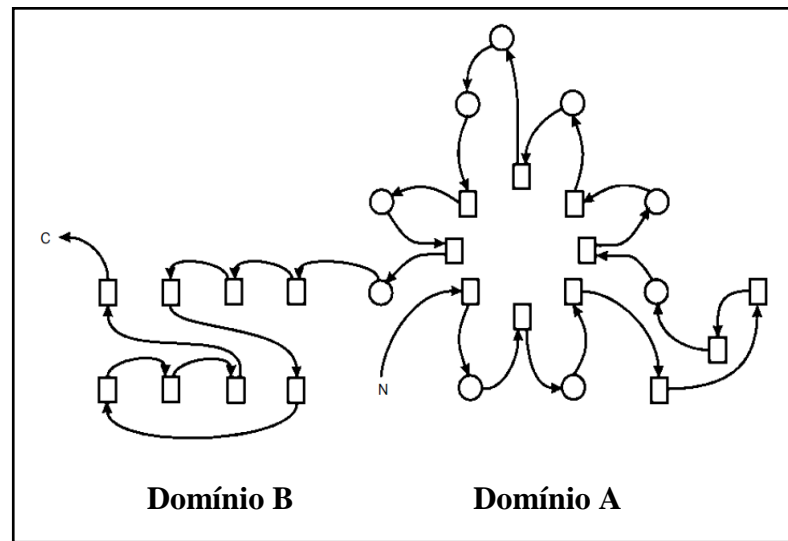
Figura 4 - Alinhamento múltiplo no programa Clustal W das sequências de aminoácidos do receptor da toxina Bin do *Lysinibacillus sphaericus* em *Culex pipiens* (Cpm1) e seus ortólogos em *Culex quinquefasciatus* (Cqm1), *Anopheles gambiae* (Agm3) e *Aedes aegypti* (Aam1).

Cpm1	---MRPLGAL	SIFALL--AT	TVSGLAIREP	DAKDWYQHAT	FYQIYPRSF	DSNGDGIGDL	55
Cqm1	---MRPLGAL	SLVALL--AM	TVNGLAIREP	DSKDWYQHAT	FYQIYPRSF	DSNGDGIGDL	55
Agm3	MKFYRPLVTV	SLTVALLSAC	ALQAAEVREP	DEKDWYQHAT	FYQIYPRSFQ	DSNGDGIGDL	60
Aam1	---MR--LCSA	GLLVTL--AV	FASSFDIREP	EQKDWYQHAT	FYQIYPRSFK	DSDGDGIGDL	54
Cpm1	AGITSKMKYL	ADIGIDATWL	SPPFKSPLKD	FGYDVSDFYA	IQPEYGNLTD	FDKLVEEAHK	115
Cqm1	AGITSKMKYL	ADIGIDATWL	SPPFKSPLKD	FGYDVSDFYA	IQPEYGNLTD	FDKLVEESHK	115
Agm3	KGITARMEYL	AGLGIDATWL	SPPFVSPHAD	FGYDVADFYD	IQPEYGTLLD	MEELIAEAHR	120
Aam1	AGITSKMSYL	ADIGIDATWL	SPPFKSPLRD	FGYDVSDFYD	IQPEYGTLES	FDELVQEAHK	114
Cpm1	NGIKLMLDFI	PNH3SDQHEW	FVKSVARDPE	YSEFYVWKP-	---PATGGG-	PPNNWISVFG	170
Cqm1	NGIKLMLDFI	PNH3SDQHEW	FVKSVARDPE	YSDFYVWRP-	---PATGGG-	PPNNWISVFG	170
Agm3	HGIKLMDFI	PNH3SDEHDW	FVQSANGVAK	YRDYIWRPG	RQNSQTGALE	PPNNWISVFG	180
Aam1	NGIKLMLDFI	PNH3SDEHDW	FVKSAAERNET	YKDFYVWHPG	RQNAETGKLD	PPNNWISVFG	174
Cpm1	GPAWTYNAAR	GEYYLHQFTP	QQPDLNRYNP	KLLAEMTKML	FFWLDRGVDG	FRLDAINHMF	230
Cqm1	GSAWTYNTAR	GEYYLHQFTP	QQPDLNRYNP	KVLAEMTKML	FFWLDRGVDG	FRLDAINHMF	230
Agm3	GPAWTYDERR	GEFYLHQFTK	KQADLNRYNP	AVVEEMTKML	SFWLEKGVDS	FRLDAINHMF	240
Aam1	GPAWTYHEGR	QEFYLHQFTD	KQPDLNRYNP	AVLEEMTKML	FFWLDRGVDG	FRLDAINHMF	234
Cpm1	EDEQFRDEPV	SGWGQSGEYD	SLDHIYTKDI	PDVYNVYVNW	RDQMDKYSAE	KGRITIIIMTE	290
Cqm1	EDEQFRDEPL	SGWGQSGEYD	SLDHIYTKDI	PDVYDVYVNW	RDQMDKYSAE	KGRITIIIMTE	290
Agm3	EDAQLRDEPP	-GWGAPGTID	ELDHIYTKDN	PDTYNVYVNW	RQLCDDFGRR	MNKITIIIMTE	299
Aam1	EDPELRDEPP	SGWSDPGKYD	SLDHIYTKDV	EDVYKVVYDW	RDLMDTYSKE	NGRITIIIMTE	294
Cpm1	AYS3IEGTML	YYESADRKRQ	GAHMPFNFQL	IYDFKKEQNA	VGLKSSIDWW	MNNMPARHTP	350
Cqm1	AYS3IEGTML	YYESADRKRQ	GAHMPFNFQL	IYDFKKEQNA	VGLKSSIDWW	MNNMPARHTP	350
Agm3	AYASIENTML	YYEDATGTRQ	GAHMPFNFQL	IYDFRHDQNA	IGLKQSIDFW	LNHMPARHTA	359
Aam1	AYS3IEGTML	YYENANRTRQ	GAHMPFNFQL	IYDFKDIQNA	VGLKQSIDWW	MNHMPARHTP	354
Cpm1	SWVAGSHD4S	RVASRVGLDR	VDQVMTLLMHT	LPGTSITYYG	EEVAMQDFKE	AQQFDNRDPN	410
Cqm1	SWVAGSHD4S	RVASRVGLDR	VDQVMTLLHT	LPGTSITYYG	EEVAMQDFKE	AQQFDNRDPN	410
Agm3	SWVAGSHD4S	RVGSRVGLRH	VDQVMTLLHT	LPGTSITYYG	EEIGMLDFKD	AQLYDNRDPN	419
Aam1	SWVSGSHD4E	RFASRVGENR	VEQMMTLLHT	LPGTSITYYG	EEIGMLDYKE	AQTYDGRDPN	414
Cpm1	RTPMQWDSST	SAGFSTNTNT	WLRVHPDYAR	YNVDVMQKNP	QSTFHFFQHL	TKLRGHRITMQ	470
Cqm1	RTPMQWDSST	SAGFSTNTNT	WLRVHPDYAR	YNVDVMQKNP	QSTFHFFQHL	TKLRRHRITMQ	470
Agm3	RTPMQWDNSI	SAGFSTNRRT	WLRVHPDYPT	RNVAMQEAAE	KSTLKHFRFL	TALRRHRITLV	479
Aam1	RTPMQWDGTT	SAGFSTNATT	WLKVHPDYAS	LNVDLQQNAE	KSHFHHFRAL	TSLRRHRITMQ	474
Cpm1	SGEYVHKTVG	TKVYALLREL	RGEDSFLTVL	NMAGAEDTVD	LGDFVNLPOK	MRVEVAQPNS	530
Cqm1	SGEYVHKTVG	TKVYALLREL	RGEDSFLTVL	NMAGAEDTVD	LGDFVNLPOK	MRVEVAQPNS	530
Agm3	HGEFKHRTVG	PDVYAFSREL	HGEDTLVTVL	NMATSSRTVD	LGDFVNLPAR	LTVEIAQPMS	539
Aam1	NGDFLHRTVG	THVYALLREL	QGRDSFLTVL	NVADKQYDAD	LGDFVNLPEK	MTVQVAQSNS	534
Cpm1	KSKAGNEVDI	SKLTLGPYDS	VVLRATVSSA	AAINLSIGLL	LAIMARYIFV	580	
Cqm1	KSKAGNEVDI	GKLTLPYDS	VVLRATVSSA	AAINLSIGLL	LAIMARYIFV	580	
Agm3	NYKAGDEVDI	HQVTLQHDS	VVLRVVVSGA	SVVRLSLIVA	LLAAVEHLF-	588	
Aam1	TLKAGDVVEI	SKVTLGPYDS	IVLRA--SSA	AAIQLSLSVV	LALIVKYFLV	582	

Fonte: Elaborada pela autora

Nota: Os aminoácidos idênticos estão marcados em preto e os similares em cinza; retângulos indicam os sítios catalíticos de α -glicosidasas.

Figura 5 - Estrutura terciária de uma α -amilase (Taka-amilase A), demonstrando a organização de α -hélices (círculos) e folhas β (retângulos) na cadeia polipeptídica.



Fonte: Adaptado de Krazikov; Karelov; Firsov (2001).

Nota: Direita. Estrutura em $(\beta/\alpha)_8$ barril do domínio A. **Esquerda.** Estrutura de folhas β antiparalelas (β -sanduíche) do domínio B.

2.9 O receptor Cqm1 e a resistência à toxina Bin

O receptor Cqm1 é o único sítio alvo para a ação da toxina Bin em larvas de *C. quinquefasciatus* e sua integridade e funcionalidade são fundamentais, pois uma falha na ligação da toxina a esta molécula, ocasiona a resistência das larvas ao Lsp. Atualmente a resistência é considerada um dos maiores obstáculos para a eficácia de larvicidas usados em programas de controle. A avaliação do mecanismo de resistência a Lsp, em colônias ou populações de *Culex*, mostrou que mutações nos genes *cpm1* e *cqm1* podem levar à produção de receptores não funcionais ou ausentes do epitélio intestinal, o que confere resistência à toxina Bin.

Foram descritos seis alelos (*cpm1_{GEO}*, *cqm1_{REC}*, *cqm1_{REC16}*, *cqm1_{REC25}*, *cpm1_{BP}*, *cqm1_R*), cujas mutações levam à produção de proteínas truncadas e desprovidas de âncora GPI e, portanto, incapazes de interagir com a toxina por não estarem disponíveis no epitélio intestinal (DARBOUX et al., 2007; DARBOUX et al., 2002; ROMÃO et al., 2006). Outro alelo, denominado *cpm1_{BP}-del*, codifica uma proteína ligada à membrana por uma âncora GPI, no entanto, a mutação é responsável por uma deleção de 66 aminoácidos que torna a proteína incapaz de ligar-se à toxina, provavelmente devido à perda do sítio de ligação à toxina ou alterações da estrutura protéica (DARBOUX et al., 2007). É importante mencionar que existem dois relatos de populações resistentes (TUNIS e SPHAE) em que as larvas

apresentam receptores funcionais no *microvilli* intestinal, indicando que outras vias estão envolvidas na resistência (NIELSEN-LEROUX et al., 1997; NIELSEN-LEROUX et al., 2002).

A caracterização dos alelos de resistência dos genes *cpm1* e *cqm1* não trouxe informações úteis para o mapeamento dos epitopos de ligação à toxina Bin, pois a principal causa da resistência é decorrente simplesmente da ausência dos receptores no epitélio intestinal devido à perda da âncora GPI (DARBOUX et al., 2002, ROMÃO et al., 2006). Nesse caso, a molécula está ausente como um todo do epitélio, não havendo indícios de regiões específicas que teriam sofrido alteração. Por outro lado, a proteína Cpm1_{BP-del}, codificada pelo alelo *cpm1*_{BP-del}, é produzida na forma de membrana, ancorada por GPI, o que pode fornecer evidências acerca dos motivos de ligação à toxina. A região deletada na Cpm1_{BP-del}, V393-Q458, pode conter os sítios de ligação à toxina ou ser importante para o envelhecimento e a conformação da proteína (DARBOUX et al., 2007).

2.10 Outros receptores de toxinas microbianas em dípteros

A interação da toxina Bin com os receptores específicos em larvas de culicídeos ainda tem sido pouco investigada. Por outro lado, o modo de ação das toxinas produzidas pelo *Bacillus thuringiensis* (Bt), com ação em larvas de lepidópteros e dípteros, tem sido bem estudado, o que tem produzido avanços em relação à base molecular da interação entre estas toxinas e os receptores do intestino. Como Lsp, Bt produz durante a esporulação as toxinas do cristal (Cry), que interagem com receptores no epitélio intestinal das larvas e levam à formação de poros na membrana. As sorovarietades de Bt com ação para dípteros produzem além das toxinas Cry a toxina citolítica (Cyt), que é capaz de inserir-se na membrana sem a atuação de receptores ou exercer uma ação tipo detergente (BRAVO et al., 2007). A estrutura dessas toxinas já foi elucidada e a maioria das toxinas Cry é constituída por três domínios funcionais, sendo o primeiro composto de sete α -hélices, o segundo por três folhas β antiparalelas e o terceiro um β -sanduíche. Os domínios II e III estão envolvidos na interação com o receptor e o domínio I na inserção na membrana, oligomerização e formação de poros. Vários epitopos de interação com receptores foram identificados nas toxinas Cry e, frequentemente, estão localizados em regiões de alça dos domínios II e III (GOMEZ et al., 2001, 2002; XIE et al., 2005). A toxina Cyt é uma molécula que apresenta um único domínio α - β que apresenta estrutura semelhante a outras toxinas de patógenos como bactérias e fungos (SOBERON; LOPEZ-DIAZ; BRAVO, 2013). Esta toxina também possui epitopos para a

ligação de outras toxinas Cry, que tem sua ação otimizada através dessa interação (CANTON et al., 2011).

Vários receptores para as toxinas Cry, sobretudo em lepidópteros já foram identificados, entre eles enzimas digestivas tais como caderinas (CADR), aminopeptidases-N (APN), fosfatases alcalinas (ALP), β -glicosidases, além de glicoconjugados, ADAM-metaloproteases (JURAT-FUENTES; ADANG, 2004; JURAT-FUENTES et al., 2004; KNIGHT; CRICKMORE; ELLAR, 1994; OCHOA-CAMPUZANO et al., 2007; VADLAMUDI et al., 1995; VALAITIS et al., 2001; YAMAGUCHI; BANDO; ASANO, 2013). Os receptores também são críticos para o modo de ação das toxinas Cry em lepidópteros e vários estudos demonstraram que mutações nos genes que codificam os receptores podem ocasionar resistência (BRAVO et al., 2011; FERRÉ et al., 1995; JURAT-FUENTES; ADANG, 2004).

Dentre as sorovariades de Bt, o *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* possui ação para culicídeos e simulídeos e vem sendo usado em diversos programas de controle desde 1980 (BECKER, 1997; LACEY, 2007; REGIS et al., 2001). A atividade larvicida do Bti para dípteros é devida à presença das toxinas inseticidas do cristal Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa e da toxina citolítica Cyt1Aa (CRICKMORE et al., 1995). Os receptores das toxinas Cry do Bti tem sido caracterizadas em culicídeos (Tab. 1). Em *Ae. aegypti*, as APNs AaeAPN1 (140 kDa) e AaeAPN2 (104 kDa), expressas no *microvilli* intestinal das larvas atuam como receptores da toxina Cry11Aa e estas moléculas ligam-se com alta afinidade (CHEN et al., 2009b; CHEN et al., 2013). CADSs atuando como receptores das toxinas Cry11Aa e Cry4Ba também foram identificadas em *Ae. aegypti* (AaeCad) e *An. gambiae* (AgCAD1 e BT-R3), respectivamente. Neste caso, os epítomos de ligação das toxinas foram identificados em regiões repetitivas do ectodomínio (CR) da caderina, localizadas entre as regiões CR8-CR11 (CHEN et al., 2009a; HUA et al., 2008; IBRAHIM; GRIKO; BULLA, 2013).

ALPs também demonstraram estar envolvidas na toxicidade do Bti para larvas de culicídeos. Em *Ae. aegypti* a ALP1 de 65 kDa foi caracterizada como receptor das toxinas Cry4Ba e Cry11Aa. Os epítomos de ligação da toxina Cry11Aa à ALP1 foram identificados e se encontram em duas regiões compreendidas entre os aminoácidos R59-G102 e N257-I296 (CHEN et al., 2009b; DECHKLAR et al., 2011; FERNANDEZ et al., 2006, 2009). Para a toxina Cry4Ba também foi identificada como receptor outra fosfatase alcalina de 58 kDa (Aa-mALP) em *Ae. aegypti* (DECHKLAR et al., 2011). As toxinas Cry4Ba e Cry11Aa também possuem uma α -amilase de 70 kDa (Aamy1) como receptor em comum em *An. albimanus*

(FERNANDEZ-LUNA et al., 2010). A família das α -amilases também alberga as α -glicosidases identificadas como receptores da toxina Bin de *L. sphaericus* (OPOTA et al., 2008; ROMÃO et al., 2006; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1999). No contexto dos estudos de interação das toxinas do Bt em insetos, a identificação destas moléculas e de seus epitopos permitiu o desenvolvimento de toxinas modificadas com maior afinidade aos respectivos receptores (FUJII et al., 2013; PORTA et al., 2011).

2.11 Papel das glicosilações na interação toxina-receptor

Estudos prévios do modo de ação das toxinas Cry também mostraram que modificações pós-traducionais nos receptores, como glicosilações, podem ser essenciais como epitopos para as toxinas (JURAT-FUENTES; ADANG, 2004). As glicosilações são modificações pós-traducionais importantes que ocorrem, principalmente, em células eucarióticas e podem afetar a estrutura protéica, localização, solubilidade, antigenicidade, atividade biológica, meia-vida e interações entre células (VARKI, 1993). Quando uma proteína é glicosilada são adicionados carboidratos à sua cadeia polipeptídica, que podem ser de quatro tipos: N-glicosilação, O-glicosilação, C-manosilação e ancoragem por glicosilfosfatidilinositol (GPI). Nas N-glicosilações, os oligossacarídeos são adicionados no grupo amino (NH_2) de resíduos de asparagina, enquanto nas O-glicosilações os glicanos são adicionados ao grupo hidroxila (OH) de resíduos de serina ou treonina (BLOM et al., 2004). As N-glicosilações são inseridas no retículo endoplasmático e influenciam o dobramento das proteínas, enquanto as O-glicosilações ocorrem principalmente no complexo de Golgi (BLOM et al., 2004).

Os estudos de interação de toxinas Cry ativas para lepidópteros e nematódeos mostraram que os glicanos de receptores têm um papel crucial para a interação. A ligação da toxina Cry1Ac à ALP que funciona como receptor em *Heliothis virescens* depende de glicanos, que são epitopos para a interação (JURAT-FUENTES; ADANG, 2004). No nematódeo *Caenorhabditis elegans* a ligação da toxina Cry5B com glicolipídios que atuam como receptores é dependente de carboidratos (GRIFFITTS et al., 2005). Em *Manduca sexta* demonstrou-se que glicanos também constituem sítios de ligação da toxina Cry1Ac ao *microvilli* intestinal (KNOWLES; KNIGHT; ELLAR, 1991). Em contrapartida, a ligação da toxina Cry11Aa à APN que atua como receptor em *Ae. aegypti* é independente de glicanos (CHEN et al., 2009b). No modelo de ação da toxina Bin em culicídeos, as α -glicosidases Cqm1 de *C. quinquefasciatus* e a proteína ortóloga Aam1 de *Ae. aegypti* possuem sítios

preditos de glicosilação, no entanto, a presença e o papel dos glicanos destas proteínas na interação com a toxina Bin não são conhecidos.

2.12 Espectro de ação da toxina Bin para larvas de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*

Neste estudo as características de α -glicosidases ortólogas, especificamente dos culicídeos *C. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti*, serão comparadas para investigar seu papel na susceptibilidade destas espécies a Lsp. *C. quinquefasciatus* é susceptível a Lsp graças à presença da α -glicosidase Cqm1, que também funciona como molécula alvo da toxina Bin. *Ae. aegypti* é uma espécie taxonomicamente relacionada que potencialmente expressa uma proteína ortóloga (Aam1), cuja sequência predita possui 83% de similaridade em relação à Cqm1, entretanto, é refratário à toxina Bin.

A hipótese central deste trabalho é que há diferenças entre estas proteínas ortólogas que determinam o perfil de susceptibilidade à toxina Bin nas larvas dessas espécies. A toxina Bin é processada de forma similar no intestino de larvas de *C. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti*, no entanto, liga-se com alta afinidade à α -glicosidase Cqm1 em larvas de *C. quinquefasciatus*, porém não apresenta ligação específica a proteínas do epitélio intestinal das larvas de *Ae. aegypti*. A razão pela qual a toxina não tem capacidade de ligação ao epitélio é desconhecida, apesar da identificação do gene ortólogo *aam1* em *Ae. aegypti* que, teoricamente, poderia codificar a proteína Aam1, um potencial receptor para a toxina Bin (NENE et al., 2007; ROMÃO et al., 2006). Além disso, a similaridade de Aam1 em relação à Cqm1 é superior à Agm3, que também funciona como receptor da toxina Bin nas larvas de *An. gambiae* (Quadro 1). Do ponto de vista taxonômico, *Ae. aegypti* está mais próximo de *C. quinquefasciatus*, pois ambos pertencem à família Culicinae, enquanto *An. gambiae* pertence à família Anophelinae. As seguintes hipóteses podem ser investigadas para explicar a refratariedade das larvas de *Ae. aegypti* à toxina Bin: a ausência de transcrição do gene *aam1*; a ausência de expressão da proteína Aam1 na fase larvária; a expressão da proteína pode não ser em quantidade suficiente para a ligação com a toxina; a expressão da proteína sob a forma solúvel ou mesmo a ausência de epitopos para interagir com a toxina; a influência de glicosilação diferencial na capacidade de ligação; a necessidade de proteínas acessórias para a ligação à toxina Bin. Considerando este contexto, o objetivo deste trabalho é identificar o epitopo de ligação da toxina Bin no receptor Cqm1 e, em paralelo, investigar a razão da refratariedade de *Ae. aegypti* à toxina Bin, subsidiado pelo estudo da proteína Aam1.

Tabela 1 - Receptores de toxinas inseticidas de *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) e *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) identificados no epitélio intestinal de larvas de culicídeos.

Entomopatógeno	Toxinas	Receptores		Espécie	Referências
		Classe	Peso (kDa)		
Lsp	Bin	α -Gli ¹ - Cpm1		<i>Culex pipiens</i>	(DARBOUX et al., 2001; OPOTA et al., 2008; SILVA-FILHA et al., 1999)
		α -Gli - Cqm1	66	<i>Culex quinquefasciatus</i>	
		α -Gli - Agm3		<i>Anopheles gambiae</i>	
Bti	Cry11Aa	CAD (AaeCad)	250	<i>Aedes aegypti</i>	(CHEN et al., 2009a)
		ALP (ALP1)	65	<i>Ae. aegypti</i>	(FERNANDEZ et al., 2006; FERNANDEZ et al., 2009; FERNANDEZ et al., 2005)
		APN ⁴ (AaeAPN1)	140	<i>Ae. aegypti</i>	(CHEN et al., 2009b)
	Cry4Ba	APN (AaeAPN2)	104	<i>Ae. aegypti</i>	(CHEN et al., 2013)
		AMY ⁵ (Amy1)	70	<i>Ae. aegypti</i>	(FERNANDEZ-LUNA et al., 2010)
		CAD ² (AgCad1)	200	<i>An. gambiae</i>	(HUA et al., 2008)
		ALP ³ (Aa-mALP)	58	<i>Ae. aegypti</i>	(DECHKLAR et al., 2011)
		ALP (ALP1)	65	<i>Ae. aegypti</i>	(JIMENEZ et al., 2012)
		CAD (BT-R3)	----	<i>An. gambiae</i>	(IBRAHIM et al., 2013)

Fonte: Elaborada pela autora**Nota :** ¹ α -Gli - α -Glicosidase; ²CAD – Caderina; ³ALP - Fosfatase alcalina; ⁴APN – Aminopeptidase; ⁵Amy

Quadro 1 - Análise comparativa entre *C. quinquefasciatus*, *An. gambiae* e *Ae. aegypti*.

Características	<i>C. quinquefasciatus</i>	<i>An. gambiae</i>	<i>Ae. aegypti</i>
Susceptibilidade a Lsp	Elevada	Moderada	Baixa
Proteína	Cqm1	Agm3	Aam1
Ligação à toxina Bin	Sim	Sim	Não
Sítios de glicosilação preditos	Três	Três	Seis
Presença de glicosilações	Não	ND	Sim

Fonte: Elaborado pela autora

Nota: ND. Não determinado

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Produzir conhecimentos acerca do mecanismo molecular de ação do biolarvicida Lsp, a fim de subsidiar o seu aperfeiçoamento e a ampliação do seu espectro de ação para o controle de insetos até então refratários ou resistentes a esse agente.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a expressão das α -glicosidases Cqm1 e Aam1 no epitélio intestinal de larvas de *C. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti*;
- b) Avaliar o papel das glicosilações na capacidade de ligação do receptor Cqm1 à toxina Bin;
- c) Delimitar regiões da proteína Cqm1 e aminoácidos requeridos para a ligação à toxina Bin;
- b) Caracterizar a base da refratariedade de larvas de *Ae. aegypti* à toxina Bin, a partir da comparação entre as proteínas Cqm1 e Aam1.

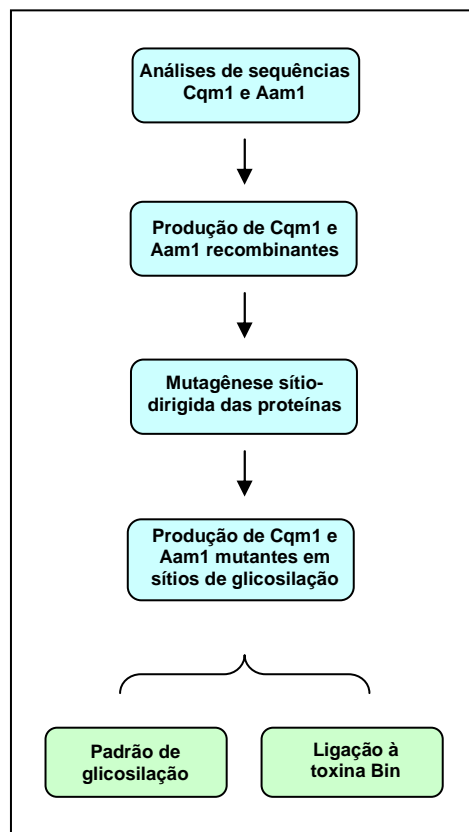
4 APRESENTAÇÃO DA TESE

Esta tese trata do modo de ação da toxina Binária do biolarvicida *Lysinibacillus sphaericus* em larvas de culicídeos, mais especificamente do estudo da interação toxina-receptor e da identificação de epitopos para esta ligação no receptor Cqm1. A tese será apresentada no formato de coletânea de artigos científicos e está dividida em três partes, cada uma delas compreendida por um artigo científico e seus respectivos dados complementares, quando necessário. A primeira parte contém um artigo científico publicado que apresenta os resultados da investigação da expressão da proteína Aam1 nas larvas de *Ae. aegypti* e sua caracterização. A segunda parte consiste em um artigo submetido, referente ao mapeamento de regiões da proteína Cqm1 requeridas para a interação com a toxina Bin, e a identificação dos resíduos de aminoácidos críticos para esta interação. A terceira parte apresenta uma mini-revisão publicada sobre o modo de ação dos biolarvicidas *Lysinibacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis israelensis*.

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Nesta seção serão descritos os procedimentos metodológicos não contemplados nos artigos e que foram realizados, para complementar os dados apresentados nestes artigos. Foi realizada uma análise *in silico* das sequências das proteínas Cqm1 e Aam1 para determinação do padrão de modificações pós-traducionais, nesse caso, N- e O-glicosilações e fosforilações. Após essa análise, as proteínas Cqm1 e Aam1 foram obtidas sob a forma recombinante, selvagem ou mutante em sítios de glicosilação, para avaliação do papel dessas modificações na capacidade de interação com a toxina Bin (Figura 6).

Figura 6 - Etapas dos procedimentos experimentais



Fonte: Elaborada pela autora

5.1 Colônias de insetos

Foram utilizadas amostras de larvas de *Culex quinquefasciatus* da colônia CqSF e de *Aedes aegypti* da colônia RecL, mantidas no insetário do Departamento de Entomologia do CPqAM, sob as seguintes condições: temperatura de 26 ± 1 °C, umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 12:12h (claro:escuro). As larvas foram mantidas em água de cloração e

alimentadas com ração para gatos. Os adultos foram alimentados com solução de sacarose a 10% e as fêmeas também fizeram o repasto sanguíneo em galinhas.

5.2 Análises *in silico* de modificações pós-traducionais

Foram feitas análises *in silico* de modificações pós-traducionais das proteínas Cqm1 e Aam1 para avaliar a presença de N-glicosilações, O-glicosilações e fosforilações, através dos preditores NetNGlyc 1.0, NetOGlyc 3.0 e NetPhos 2.0, respectivamente. Os sítios de N-glicosilação correspondem a trincas de aminoácidos formadas pelos aminoácidos Asn-X-Ser/Thr, onde o aminoácido X não pode ser a prolina, visto que a presença desse aminoácido após a asparagina pode torná-la inacessível e impedir a glicosilação. Embora essa sequência consenso seja requerida, nem sempre é suficiente para que haja a inserção de carboidratos, tornando necessária a avaliação de outros parâmetros pelos preditores. Cada sítio possui um potencial de glicosilação, que é baseado em resultados de parâmetros de nove redes neurais. Quanto mais parâmetros derem suporte à predição, maior a confiabilidade do resultado. O preditor utiliza como critério para considerar um sítio potencial de glicosilação o valor de uma linha de base ou *threshold* igual a 0,5. Este potencial pode ser considerado maior de acordo com a concordância com nove redes neurais estabelecidas pelo preditor. Os potenciais de glicosilações são representados por sinais (+/-): +. potencial maior que 0,5; ++. potencial maior que 0,5 e concordância de 9 redes para suportar a predição ou potencial maior que 0,75; ++++. potencial maior que 0,75 e concordância de 9 redes para suportar a predição; ++++. potencial maior que 0,9 e concordância de 9 redes para suportar a predição; -. potencial menor que 0,5; --. potencial menor que 0,5 e concordância de 9 redes para suportar a predição menor que 0,5; ---. potencial menor que 0,32 e concordância de 9 redes para suportar a predição.

5.3 Clonagem e expressão dos genes *cqm1* e *aam1*

As proteínas Aam1 e Cqm1 recombinantes foram produzidas em células eucarióticas Sf9, sob as formas selvagens ou modificadas. Para tal, os respectivos genes foram clonados em vetores plasmidiais de expressão e foram submetidos à mutagênese sítio-dirigida, no caso da produção de proteínas mutantes. Nesta seção foram obtidas proteínas contendo mutações em sítios de glicosilação, baseado na análise das predições *in silico*.

5.3.1 Extração de RNA, RT-PCR e PCR

O RNA necessário à produção do cDNA do genes *cqml* e *aaml* foi obtido de um pool de 40 larvas ou adultos de *C. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti*, segundo Romão et al. (2006). O RNA total obtido foi submetido à purificação com fenol-clorofórmio e quantificado por espectrofotometria a 260 e 280 nm. Para a obtenção do cDNA foram realizadas reações de transcrição reversa (RT-PCR), utilizando o *primer* oligo DT20 (Invitrogen), que é capaz de anelar à cauda poli-A de todos os mRNAs na amostra de RNA total extraído. Foram utilizados em cada reação: 13 µg do RNA total obtido, 7,5 U de transcriptase reversa AMV® (GIBCO), 2 mM do primer Oligo DT20™ e dNTPs, durante 1 h a 37°C, segundo informações do fabricante. As reações de PCR foram realizadas utilizando o cDNA obtido e *primers* específicos. As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador BIOMETRA® nas seguintes condições: uma etapa de desnaturação a 94 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 50 seg, 55 °C por 50 seg, 72 °C por 120 seg e uma etapa final a 72 °C por 10 min. As amostras foram separadas por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 8.9 mM, EDTA 2 mM) 0.5X. O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado em um transiluminador de luz UV.

5.3.2 Clonagem e sequenciamento

Os produtos amplificados dos genes *cqml* e *aaml*, obtidos nas reações de PCR, foram submetidos à purificação com o kit GFX DNA and Gel Band Purification® (GE Healthcare) e em seguida, os fragmentos foram inseridos no vetor plasmidial pGEM®-T Easy (Promega), segundo as instruções do fabricante. Os plasmídeos recombinantes obtidos foram utilizados na transformação de células de *Escherichia coli* TOP10 quimiocompetentes (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante. Após o crescimento bacteriano, foram obtidas preparações de DNA plasmidial através do kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) para a obtenção dos clones de interesse. As preparações de DNA plasmidial foram digeridas com as endonucleases de restrição *Kpn* I e *Xba* I a 37 °C e os fragmentos liberados foram purificados e subclonados no vetor plasmidial pIZT/V5-His (Invitrogen), para a expressão protéica em células eucarióticas Sf9. Esse vetor apresenta importantes características tais como um promotor constitutivo, uma marca de resistência ao antibiótico zeocina® para a seleção de células transfectadas, um gene da GFP (*Green Fluorescent Protein*) para a visualização das

células transfectadas e uma sequência codificante de uma cauda de poli-histidinas para a purificação protéica.

Os plasmídeos contendo o fragmento dos genes *cqml* e *aaml* foram enviados para sequenciamento automático no ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM. Os “contigs” foram montados no programa SeqMan (DNASTar), a partir dos eletroferogramas obtidos nas reações de sequenciamento e as sequências foram editadas no programa EditSeq (DNASTar). A identidade dos fragmentos foi confirmada pela comparação das seqüências obtidas com aquelas disponíveis no GenBank, através da ferramenta BLASTp do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov). A etapa de obtenção dos genes *cqml* e *aaml* selvagens clonados nos vetor de expressão pIZT/V5-His (Invitrogen) foi realizada pela Dra. Tatiany Romão, pesquisadora colaboradora do Departamento de Entomologia.

5.3.3 Mutagênese sítio-dirigida para modificações em sítios de N-glicosilação

Após a análise *in silico* foram feitas modificações em sítios preditos de N-glicosilação dos genes *cqml* e *aaml*, utilizando o procedimento de mutagênese sítio-dirigida descrito a seguir. Para investigar se o padrão de N-glicosilação tem influência na capacidade de ligação com a toxina Bin, foram realizadas duas abordagens. Na primeira, os sítios de glicosilação da Aam1 foram substituídos pelos aminoácidos correspondentes da Cqm1, que não sinalizam glicosilação, ou por trincas de alaninas, com o objetivo de produzir uma proteína desprovida de carboidratos na cadeia. Na segunda abordagem, os aminoácidos da Cqm1, em posições que são sítios de glicosilação na Aam1, foram substituídos pelos aminoácidos da Aam1 para verificar a inserção de carboidratos.

O procedimento de mutagênese foi realizado nos plasmídeos pIZT/V5-His (Invitrogen), contendo os genes *cqml* e *aaml* previamente clonados, utilizando o kit de mutagênese sítio-dirigida QuikChange® (Stratagene), segundo instruções do fabricante. O produto da mutagênese foi utilizado na transformação de células de *E. coli* XL1Blue eletrocompetentes e elas foram utilizadas na obtenção de preparações de DNA plasmidial, conforme descrito na seção anterior. A eficácia da mutagênese foi avaliada através da análise de seqüências dos genes contidos nos plasmídeos, segundo o item 4.3.2.

5.4 Produção de proteínas recombinantes em células Sf9

Para a produção das proteínas recombinantes foi escolhido o sistema de expressão em células eucarióticas Sf9. Essa estratégia foi utilizada, pois dados preliminares (FERREIRA, 2009) demonstraram que a utilização do sistema de expressão em células de *Escherichia coli* não é indicado, visto que a maquinaria disponível na célula procariótica não é capaz de propiciar o correto dobramento protéico ou a inserção de modificações pós-traducionais como as glicosilações. Os genes *aam1* e *cqm1* selvagens ou mutantes foram clonados no plasmídeo pIZT/V5-His[®] (Invitrogen), e os plasmídeos recombinantes foram utilizados para a transfecção e produção das proteínas no sistema de expressão heterólogo de linhagem de células de tecido ovariano pupal do lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (Sf9).

5.4.1 Transfecção de células Sf9

Para a realização da transfecção foi utilizado o Kit InsectSelect™Glow System (Invitrogen), segundo as recomendações do fabricante. Os plasmídeos pIZT/V5-His (Invitrogen), foram introduzidos nas células Sf9 através de transfecção mediada por lipídeos utilizando o reagente CelfectinII[®] (Invitrogen) e o cultivo celular em confluência. Para a realização da transfecção, 1×10^6 células foram acondicionadas em placas de Petri utilizando o meio de cultura Sf900 II SFM[®] (Invitrogen) e acrescidas do DNA plasmidial (5 µg) e do reagente Cellfectin II[®] a 4%. Após esta etapa, as placas foram incubadas a TA durante 4 h sob agitação lenta e, em seguida, foram incubadas em estufa a 28°C. Após 48 h da transfecção, as linhagens celulares transfectadas foram selecionadas em meio de cultura suplementado com o antibiótico zeocina[®] (150-300 µg/ml), segundo as instruções do kit.

5.4.2 Análise da expressão de proteínas recombinantes

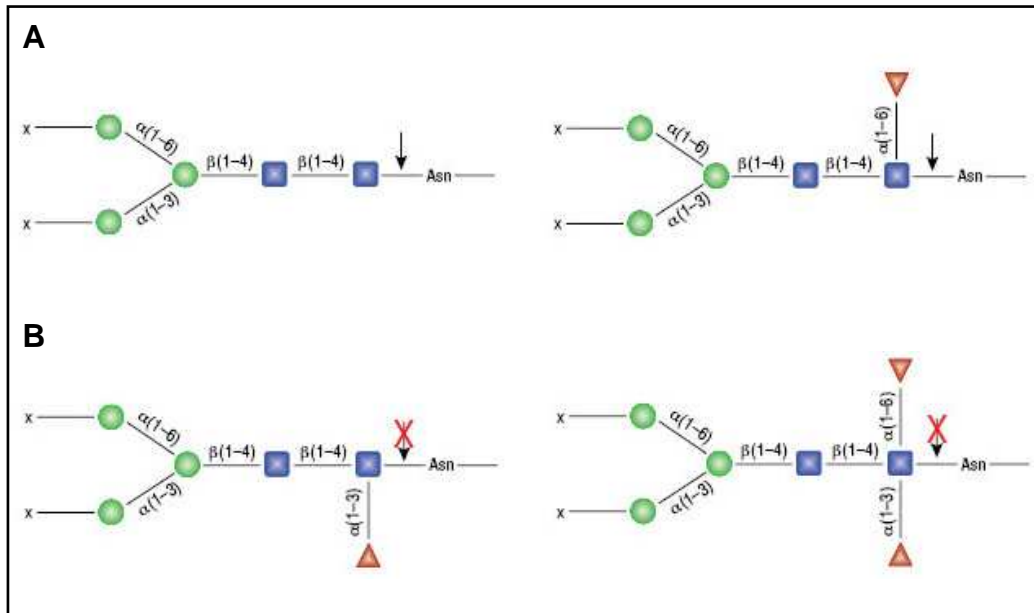
As proteínas recombinantes foram produzidas sob a forma de proteína solúvel, ou seja, desprovidas de âncora GPI. A porção do gene clonado codifica uma proteína truncada com 561 e 563 aminoácidos para Cqm1 e Aam1, respectivamente. Para avaliar a expressão protéica das linhagens transfectadas, o meio do cultivo celular em confluência foi coletado e as proteínas precipitadas pelo ácido tricloroacético (TCA) ou purificadas com a resina de níquel Ni-NTA[®] (QIAGEN). As amostras foram submetidas a SDS-PAGE 10% para avaliar a presença das proteínas. O meio contendo as proteínas de interesse foi utilizado, diretamente

ou sob a forma purificada, em ensaios de interação dessas proteínas com a toxina Bin, segundo o item 4.6. O conteúdo protéico das amostras foi mensurado segundo o método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando uma curva de albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

5.5 Padrão de glicosilações de proteínas

A glicosilação das proteínas Cqm1 e Aam1 recombinantes foi investigado através do tratamento das amostras com a endoglicosidase PNGase F (New England Biolabs), que é capaz de remover carboidratos presentes na cadeia polipeptídica de glicoproteínas. A PNGase F cliva ligações entre resíduos de N-acetilglicosamina e asparagina em oligossacarídeos complexos e com elevado teor de manose (Figura 7), entretanto, não é capaz de clivar N-glicanos quando há resíduos de α 1-3 fucose ligados à N-acetilglicosamina, o que é muito comum em algumas glicoproteínas de insetos e plantas. As proteínas foram submetidas ao tratamento com a enzima, segundo instruções do fabricante. Dados prévios já demonstraram que grande parte ou a totalidade de carboidratos existentes na proteína Aam1 podem ser removidos pela enzima PNGase F (FERREIRA et al., 2010), o que permitiu a avaliação de modificações feitas nos sítios de glicosilação que pretendia-se abolir.

Figura 7 - Especificidade da PNGase F



Fonte: www.neb.com/products/p0704-pngase-f

Nota: A. A PNGase não cliva quando há uma fucose $\alpha(1-3)$ no core GlcNAc. B. A PNGase cliva quando há uma fucose $\alpha(1-6)$ no core GlcNAc. Círculo verde: manose; Quadrado azul: N-acetilglicosamina; Triângulo vermelho: fucose.

5.6 Ensaios de funcionalidade das proteínas Cqm1 e Aam1

Nesta etapa, as proteínas recombinantes, selvagens ou mutantes, tratadas ou não com a PNGase, foram submetidas a ensaios de funcionalidade para investigar a sua capacidade de ligação à toxina Bin. As proteínas foram avaliadas em ensaios de *pull-down* utilizando a subunidade BinB da toxina, produzida em *E. coli*, segundo Romão et al. (2011) e imobilizada em resina glutationa sefarose 4B[®] (GS) (Amersham) (DHALIA et al., 2005). A toxina BinB imobilizada (Bin-GS) foi incubada com as proteínas-teste a 4 °C, durante 2 h, sob agitação. A especificidade da ligação foi avaliada utilizando-se um controle negativo, no qual as proteínas testadas foram incubadas com a proteína glutationa S-transferase (GST), imobilizada sobre a resina (GST-GS). Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 4 °C a 12.000g, durante 2 min. O sedimento de resina obtido foi submetido a SDS-PAGE e as proteínas do gel transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi submetida à imunodeteção com anticorpo anti-Cqm1, capaz de reconhecer as proteínas Cqm1 e Aam1 testadas, conforme descrito previamente (FERREIRA et al., 2010; ROMÃO et al., 2006).

6 ARTIGO 1 - The orthologue to the Cpm1/Cqm1 receptor in *Aedes aegypti* is expressed as a midgut GPI-anchored α -glucosidase, which does not bind to the insecticidal binary toxin

6.1 Apresentação e objetivos

Lysinibacillus sphaericus (Lsp) possui um espectro de ação para larvas de culicídeos com toxicidade decrescente para espécies dos gêneros *Culex*, *Anopheles* e *Aedes*. O principal fator inseticida de Lsp é a toxina binária (Bin), que age através de receptores que são α -glicosidasas localizadas no epitélio intestinal das larvas. O receptor em *C. quinquefasciatus* foi caracterizado e denominado Cqm1 (*Culex quinquefasciatus* maltase 1), uma α -glicosidase com 580 aminoácidos, ancorada à membrana do epitélio intestinal por uma molécula de GPI. Lsp possui toxicidade variável para espécies de *Aedes* e *Ae. aegypti*, em particular, é considerado uma espécie refratária, pois a concentração letal da toxina Bin é entre 100 e 1000 vezes superior àquela para larvas de *C. pipiens*, o grupo mais susceptível a Lsp. Estudos prévios mostraram que a toxina Bin não apresenta ligação específica a proteínas do epitélio intestinal de larvas de *Ae. aegypti*.

Por ser produzida na forma de protoxina, a toxina Bin precisa sofrer processamento proteolítico no lúmen intestinal das larvas, que se dá pela ação de serina-proteases, para atingir a sua forma ativa. Estudos prévios demonstraram que tal processamento em *Ae. aegypti* ocorre de maneira semelhante ao que ocorre em *C. quinquefasciatus*, corroborando a hipótese de que a refratariedade não está relacionada com as etapas de processamento proteolítico e sim devido a uma falha da ligação da toxina Bin ao *microvilli* intestinal das larvas. Apesar de *Ae. aegypti* ser considerado refratário a Lsp, esta espécie é taxonomicamente muito próxima a *C. pipiens* e a análise do seu genoma mostrou um gene que codifica uma proteína ortóloga (Aam1) à proteína Cqm1 de *C. quinquefasciatus* e dois genes que codificam proteínas parálogas à Aam1. Dessa forma surgiu a necessidade de investigar se a proteína ortóloga Aam1 é expressa no epitélio intestinal das larvas de *Ae. aegypti* e, caso tal hipótese se confirme, quais seriam os fatores que impossibilitam a sua ligação com a toxina Bin.

A primeira parte desta seção consiste em um artigo científico publicado, que apresenta os resultados relativos à investigação da presença do gene *aam1*, a expressão da proteína Aam1, bem como sua especificidade de interação com a toxina Bin. Na segunda parte, serão apresentados dados complementares referentes à investigação da presença de modificações pós-traducionais nas proteínas Cqm1 e Aam1 e a sua influência na capacidade dessas

moléculas interagirem com a toxina Bin. Nesta seção são apresentados seis objetivos, sendo os três primeiros abordados no artigo Ferreira et al., 2010 e os demais nos dados complementares ao artigo, que estão em fase de preparação para publicação. Os objetivos foram os seguintes:

- a) Analisar a presença de transcritos do gene *aam1*, que codifica a proteína ortóloga Aam1, e de genes que codificam proteínas parálogas em larvas de *Ae. aegypti*;
- b) Avaliar a expressão da proteína Aam1 no *microvilli* intestinal de larvas de *Ae. aegypti*;
- c) Caracterizar a proteína Aam1 em relação à localização no epitélio, à capacidade de ligação à toxina Bin e à presença de glicosilações;
- d) Avaliar *in silico* os sítios preditos de glicosilação e fosforilação nas sequências das proteínas Cqm1 e Aam1;
- e) Avaliar *in vivo* o padrão de glicosilação das proteínas Cqm1 e Aam1, selvagens ou mutantes em sítios de glicosilação, produzidas sob a forma recombinante em células Sf9;
- f) Avaliar o papel das glicosilações na funcionalidade das proteínas Aam1 e Cqm1 recombinantes.



The orthologue to the Cpm1/Cqm1 receptor in *Aedes aegypti* is expressed as a midgut GPI-anchored α -glucosidase, which does not bind to the insecticidal binary toxin

Lígia Maria Ferreira^a, Tatiany Patrícia Romão^a, Osvaldo Pompílio de-Melo-Neto^b,
Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha^{a,*}

^aDepartment of Entomology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife-PE 50670-420, Brazil

^bDepartment of Microbiology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife-PE 50670-420, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 March 2010

Received in revised form

14 May 2010

Accepted 27 May 2010

Keywords:

Bin toxin

Bacillus sphaericus

Bioinsecticides

Receptor

Toxin binding

Glycosylation

ABSTRACT

Aedes aegypti larvae are refractory to the insecticidal binary (Bin) toxin from *Bacillus sphaericus*, which is not able to bind to its target tissue in the larval midgut. In contrast, *Culex pipiens* larvae are highly susceptible to that toxin, which targets its midgut brush border membranes (BBMF) through the binding of the BinB subunit to specific receptors, the Cpm1/Cqm1 membrane-bound α -glucosidases. The identification of an *Ae. aegypti* gene encoding a Cpm1/Cqm1 orthologue, here named Aam1, led to the major goal of this study which was to investigate its expression. The *aam1* transcript was found in larvae and adults from *Ae. aegypti* and a \approx 73-kDa protein was recognized by an anti-Cqm1 antibody in midgut BBMF. The Aam1 protein displayed α -glucosidase activity and localized to the midgut epithelium, bound through a GPI anchor, similarly to Cpm1/Cqm1. However, no binding of native Aam1 was observed to the recombinant BinB subunit. Treatment of both proteins with endoglycosidase led to changes in the molecular weight of Aam1, but not Cqm1, implying that the former was glycosylated. The findings from this work rule out lack of receptors in larval stages, or its expression as soluble proteins, as a reason for *Ae. aegypti* refractoriness to Bin toxin.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Aedes aegypti is the major vector responsible for the transmission of dengue in the Americas, a disease which constitutes a major health problem in a number of different countries. So far, interruption of disease transmission relies on vector control actions and bioinsecticides based on the bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* (Bti) have been used as effective tools to reduce the population density of *Ae. aegypti* (Armengol et al., 2006; Lee and Zairi, 2006; Regis et al., 2008). Toxicity of Bti depends on the Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa and Cyt1Aa insecticidal proteins, which act synergistically and display specific action against species of *Aedes*, *Culex* and *Anopheles*. *B. sphaericus* is another commercially available bioinsecticide used to control culicid larvae whose activity is associated with a single heterodimeric crystal protein, the binary (Bin) toxin (Baumann et al., 1985; Broadwell and Baumann, 1987; Baumann et al., 1988). This insecticidal protein displays high toxicity against *Culex*, *Anopheles* and *Aedes* larvae, however *Ae.*

aegypti is considered a refractory species since the lethal concentration of Bin toxin is about 100-fold higher than that for *C. pipiens* larvae (Nielsen-LeRoux and Charles, 1992). The mode of action of Bti and *B. sphaericus* insecticidal proteins is similar and involves ingestion of crystals, dissolution under alkaline pH, proteolytic processing of protoxins into toxins and specific binding of active toxins to membrane-bound midgut receptors, the later a critical step which determines the spectra of action of these toxins (Regis et al., 2001; Lacey, 2007). Bin toxin binding to the receptors triggers a set of cytopathological events in the midgut epithelium which result in larval death (Charles, 1987; Singh and Gill, 1988; de Melo et al., 2008). Action of Bin toxin on larvae midgut depends on the processing of the 51- (BinB) and 42-kDa (BinA) subunits into 43- and 39-kDa active fragments, respectively, which act in synergy and present optimal toxicity at equimolar concentration (Nicolas et al., 1993; Charles et al., 1997). Bin toxin, through its BinB subunit, recognizes and binds to a 66-kDa glycosylphosphatidylinositol (GPI) membrane bound α -glucosidase which acts as a receptor in *C. pipiens* (Cpm1), *C. quinquefasciatus* (Cqm1) and *An. gambiae* (Agm3) larvae, all *B. sphaericus* susceptible species (Silva-Filha et al., 1997, 1999; Darboux et al., 2001; Pauchet et al., 2005;

* Corresponding author. Tel.: +55 81 21012553; fax: +55 81 21012516.

E-mail address: mhneves@cpqam.fiocruz.br (M.H.NevesL. Silva-Filha).

Romão et al., 2006; Opota et al., 2008). *Ae. aegypti*, despite its close taxonomic position to the highly susceptible species from the *C. pipiens* complex, is refractory to *B. sphaericus*. Previous studies demonstrated that this condition is not related to the capacity of proteolytic processing of insect midgut, but rather to the failure of active Bin toxin to bind to brush border membranes (BBMF) (Nielsen-LeRoux and Charles, 1992).

In silico analysis of *Ae. aegypti* genome revealed a gene which encodes an orthologue of the Bin toxin receptor, here named Aam1. This orthologue displays 74% identity to the Cqm1 α -glucosidase, which is higher than the 66% identity found between Cqm1 and Agm3, the functional Bin toxin receptor in *An. gambiae* (Romão et al., 2006; Nene et al., 2007; Opota et al., 2008). The high level of conservation between the Aam1 and Cqm1 sequences highlights the need to investigate the mechanisms behind the refractoriness of *Ae. aegypti* larvae to the Bin toxin, since the lack of Bin toxin binding to BBMF could result from inadequate expression of a potential receptor, or, to its inability to bind to the toxin. The major goal of this study was to investigate Aam1 expression in *Ae. aegypti* in order to understand factors involved in its refractoriness and to provide knowledge on the molecular basis of the Bin toxin interaction with cell receptors in the midgut of culicid larvae.

2. Materials and methods

2.1. Mosquito colonies

Aedes aegypti (Recl) and *Culex quinquefasciatus* (CqSF) colonies maintained for more than 10 years in the insectarium of the Department of Entomology/Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ were used in this work. Insects were reared at 26 ± 1 °C, 70% relative humidity and photoperiod of 12:12 h light/darkness. Larvae were maintained in deionised water and fed with cat biscuits. Adults were maintained on 10% sucrose solution and the females were also fed with chicken blood.

2.2. Sequence analysis

Blast searches were carried out to identify Cqm1 orthologue and paralogues in *Ae. aegypti* genome available at GenBank databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sequence alignment was performed with ClustalW (<http://www.cmbi.kun.nl/bioinf/tools/clustalw.shtml>) and manual refinement was done, when needed. NetNGlyc 1.0 predictor was used to identify potential putative N-glycosylation sites.

2.3. Reverse transcription

Ae. aegypti RNA extraction was carried out from pools of 4th instar larvae or adults from Recl colony using Trizol reagent, as previously described (Romão et al., 2006). Reverse transcription was performed at 37 °C, for 1 h using 13 μ g of total RNA, 7.5U of AMV[®] reverse transcriptase (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) and 2 μ M of the Oligo DT20[®] primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). PCR reactions were performed to amplify the *aam1* cDNA using specific primers designed based on the gene sequence (GenBank accession no. XP_001660909) Fwd (5'-GCA CTG CAG AGT TCG GCT GAC GAG ATG-3') and Rev (5'-GAA AAG CTT CTA CAC TAA GAA ATA CT-3'). Forward and reverse primers contain restriction sites for the *Pst*I and *Hind*III enzymes, respectively (underlined). Specific primers were used to amplify the cDNA from two *aam1* paralogue sequences. P1 (GenBank accession no. EAT45278) Fwd (5'-GCA GGA TCC ACT TCG AAA TGG TAT TAA CG-3') and Rev (5'-GAG AAG CTT AAG CCT CGA TTA CTG CTC-3'); P2 (GenBank accession no. EAT48295) Fwd (5'-CAA GGA TCC CAA CTG CTT ACT GCA ACA TG-3') and Rev (5'-GAG GAA TTC TTC TAT GAC TCA TAC TCC-3'). Forward

and reverse P1 primers contain restriction sites for the *Bam*HI and *Hind*III enzymes and P2 primers contain restriction sites for the *Bam*HI and *Eco*RI enzymes, respectively (underlined).

2.4. Cloning and expression of *Aam1* and *Cqm1* in *Escherichia coli*

Amplified fragments from *cqm1* and *aam1* genes were purified using GFX DNA and Gel Band Purification[®] kit (GE Healthcare) and transferred to the plasmid vector pRSETc[®] (Invitrogen) for protein expression in *E. coli*. Recombinant plasmids containing fragments of the *aam1* and *cqm1* genes were sequenced to confirm their identities and used for the expression of the 45-kDa truncated recombinant protein in competent cells of strain BL21 star. The Aam1 truncated protein was produced and purified, as described previously for Cqm1 (Romão et al., 2006).

2.5. Protein samples

Whole crude extracts of *Ae. aegypti* and *C. quinquefasciatus* were obtained from 1st to 4th instar larvae and adults, which were homogenized in 20 μ l of PBS pH 7.4, supplemented with 0.02% of sodium azide and 10 mM PMSF (Sigma, St Louis, MO, USA), used as protease inhibitor. Samples were centrifuged at 1500 g for 2 min at 4 °C and the supernatant was collected to be used as crude extract samples. Brush border membrane fractions (BBMF) from 4th instar whole larvae and CHAPS-solubilized proteins from BBMF (CHAPS-extracts) were obtained as previously described (Silva-Filha et al., 1997, 1999). Crude extracts, BBMF and CHAPS-extracts were stored at -70 °C until use. Protein contents were determined by the Bio-Rad protein assay[®] (Biorad, Hercules, CA, USA) using a bovine serum albumine (BSA) standard curve. Enrichment of BBMF and CHAPS-extracts was evaluated through the detection of α -glucosidase activity (EC 3.2.1.20), a marker for proteins from apical cell membranes. Samples were incubated in 0.1 M sodium citrate-phosphate buffer pH 6.5 with 2 mM of p-nitrophenyl- α -D-glucanopyranoside (Sigma, St Louis, MO, USA) at 37 °C for 1 h, and the absorbance was recorded at 405 nm.

2.6. SDS-PAGE and immunoblotting

Protein samples were separated on 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose ECL[®] membranes (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). Membranes were blocked in 50 mM Tris-HCl/150 mM NaCl/0.1% Tween 20 pH 7.6, containing 5% nonfat dry milk. Cqm1/Aam1 detection was carried out through incubation with anti-Cqm1 antibodies, affinity purified from a rabbit polyclonal serum, at a 1:200 dilution, followed by incubation with the secondary serum, goat anti-rabbit antibodies conjugated to horseradish peroxidase, at a 1:20,000 dilution. The blots were developed using the ImmobilonWestern HRP Substrate[®] (Millipore, Billerica, MA, USA).

2.7. PI-PLC treatment

Ae. aegypti BBMF (100 μ g) was incubated with 1 unit of *B. cereus* PI-PLC (Sigma) for 90 min at 30 °C in 200 μ l of sodium phosphate buffered saline (2.1 mM NaH₂PO₄/14 mM Na₂HPO₄/150 mM NaCl, pH 7.4). Protein samples were centrifuged at 18,000 g for 30 min, pellet and supernatant were assayed for α -glucosidase activity and used in immunoblotting with anti-Cqm1 antiserum. Negative control samples were incubated without PI-PLC under the same conditions.

2.8. α -glucosidase assays

BBMF samples (15 μ g) from *C. quinquefasciatus* and *Ae. aegypti* solubilized in SDS-PAGE sample buffer, without beta-mercaptoethanol and without being heated, were separated on 8% SDS-PAGE at

4 °C and submitted to enzymatic detection as previously described (Romão et al., 2006). Gels were also submitted to immunodetection as described in section 2.6. PI-PLC treated *Ae. aegypti* BMBF samples, pellets and proteins from supernatants, were submitted to α -glucosidase activity assay by incubating at 37 °C in 100 mM of citrate-phosphate buffer pH 6.5 with 2 mM *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (Sigma) as the substrate. Non treated samples, submitted to the same incubation conditions described above, were used as a negative control.

2.9. Bin toxin

The gene encoding the BinB subunit from *B. sphaericus* Bin toxin was amplified from a *B. thuringiensis* recombinant strain containing the pGSP10 plasmid (Bourgouin et al., 1990). Specific primers Fwd (5'-CACGGATCCATGTGCGATTCAAAGACAATTC-3') and Rev (5'-CACCTCGAGCTGGTTAAATTTAGGTATTAATTC-3'), containing *Bam*HI and *Xho*I restriction sites (underlined) were used in the amplification of the gene which was subsequently cloned into the expression vector pGEX 4T3. Selected PCR products were subjected to automatic sequencing to confirm their identity and integrity. Recombinant BinB subunit was expressed in *E. coli* BLR cells fused to glutathione S-transferase (BinB-GST) and purified as described previously (de Melo Neto et al., 1995).

2.10. Pull-down assays

Pull down assays were carried out as previously described (Dhalia et al., 2005). Briefly, CHAPS-extracts (20 μ g) samples were incubated with BinB-GST (2 μ g) immobilized on glutathione-sepharose 4B[®] (GE Healthcare) beads (10 μ l) (BinB-beads), for 2 h at 4 °C in BB3 buffer (100 mM KCl/1 mM MgCl₂/50 mM HEPES/0.2% NP40/5% glycerol), under agitation. Non-specific binding was determined by incubating CHAPS-extract with glutathione-S-transferase immobilized on glutathione-sepharose (GST-beads). After incubation with CHAPS-extracts, BinB- or GST-beads were collected by centrifugation at 1.500 g, for 2 min at 4 °C and washed three times with BB3 buffer. Samples were solubilized in sample buffer, boiled for 5 min and separated on 10% SDS-PAGE. Protein samples were submitted to immunoblotting as described in section 2.6.

2.11. Enzyme deglycosylation

Deglycosylation of Aam1 and Cqm1 proteins was carried out using *N*-glycosidase F (PNGase F) and Endoglycosidase H (Endo H) (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Native or denatured *C. quinquefasciatus* and *Ae. aegypti* CHAPS-extracts were treated according to manufacturer's instructions. Briefly 10–20 μ g of proteins from CHAPS-extracts and 2U of PNGase F or Endo H were

incubated at 37 °C for 1 h, in duplicates. CHAPS-extracts incubated under the same conditions in the absence of the enzyme, were used as untreated control. Samples were submitted to pull down assays, SDS-PAGE and immunoblotting as described in sections 2.10 and 2.6, respectively, in order to evaluate deglycosylation of proteins as well as their ability to bind BinB after treatment.

3. Results

3.1. Comparative analysis of sequences

The Cqm1, Agm3 and Aam1 orthologues (GenBank accessions no. ABC59609, no. ABW98683 and no. XP_001660909, respectively) share extensive segments identical in sequence spread out throughout their length. N- and C-terminal ends are more diverged in sequence but all are rich in hydrophobic residues and compatible with similar roles in protein secretion and GPI anchoring (Supplementary Fig. 1). No features within the Aam1 sequence, such as elements conserved in Cqm1 and Agm3 but missing from this orthologue, are observed through sequence analysis alone which could explain its lack of binding to the Bin toxin, although it cannot be discarded that single amino acid residues which differ between the three proteins could be critical for the interaction with the toxin.

3.2. Expression analysis of the *aam1* transcript

To investigate the possibility that Bin toxin binding failure to BMBF might be due to lack of expression of a potential receptor in larval stages, the presence of *aam1* transcript was first assayed through RT-PCR using RNA samples from different *Ae. aegypti* developmental stages. A single PCR band of the expected size for the *aam1* cDNA (~1.8 kb) was detected in samples from larvae and adult (Fig. 1A and B). In contrast, RT-PCR of two *aam1* paralogue α -glucosidases genes only produced the expected band in samples from adult tissues (Fig. 1B). This result is consistent with the *aam1* gene being constitutively transcribed throughout the insect life cycle. Presence of the *aam1* RNA does not necessarily mean that the mature polypeptide is being expressed in insect life stages. To analyze the expression of Aam1 native protein, a polyclonal serum raised against an N-terminal 45-kDa recombinant fragment of Cqm1 (Romão et al., 2006) was evaluated. Anti-Cqm1 serum recognized, with similar intensity, an equivalent Aam1 45-kDa recombinant fragment produced in *E. coli* (Fig. 1C), and therefore was used for further studies of native *Ae. aegypti* samples.

3.3. Expression of Aam1 in larvae midgut

Immunoblotting of whole crude extracts from *Ae. aegypti* using anti-Cqm1 allowed the detection of a \approx 73-kDa candidate protein

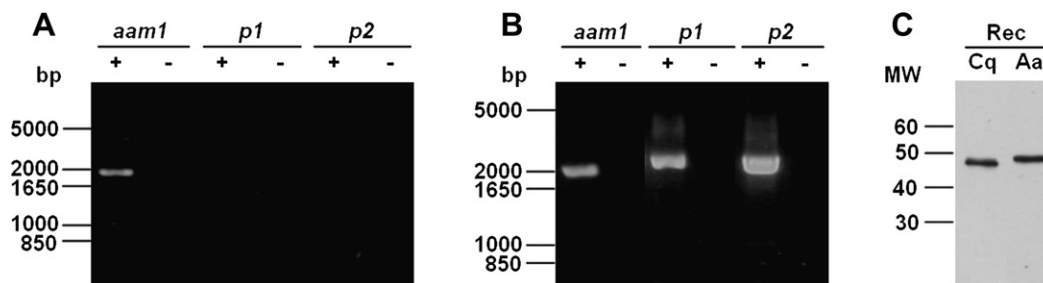


Fig. 1. Detection of *aam1* mRNA from *Aedes aegypti* and the respective Aam1 recombinant protein. (A) RT-PCR to detect *aam1* mRNA and two paralogues (*p1*, *p2*) mRNA from larvae, reactions were carried out in the presence (+) or absence (-) of the reverse transcriptase enzyme. (B) RT-PCR to detected mRNA described in A, using adults samples. Molecular weight markers in base pairs (bp). (C) Immunoblotting of Cqm1 (Cq) and Aam1 (Aa) 45-kDa recombinant proteins produced in *Escherichia coli*. Two μ g of proteins were separated on 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and submitted to immunodetection with an anti-Cqm1 antibody. MW, molecular weight markers in kDa.

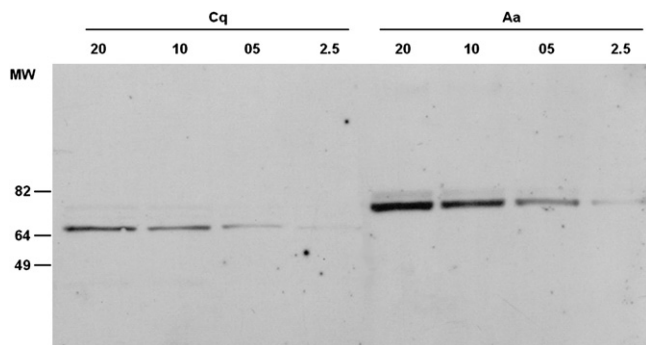


Fig. 2. Immunoblotting of midgut brush border proteins from *Culex quinquefasciatus* (Cq) and *Aedes aegypti* (Aa) larvae. Proteins samples (2.5 to 20 µg) were separated on 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and submitted to immunodetection with an anti-Cqm1 antibody. MW, molecular weight markers in kDa.

which is present in all larval stages, as well as in female and male adults (data not shown). This analysis was further performed in BBMF samples and a protein of the same size was detected, confirming its localization to the midgut of *Ae. aegypti* larvae (Fig. 2, Aa). In equivalent samples from *C. quinquefasciatus*, used as a control, the 66-kDa protein corresponding to Cqm1 was recognized (Fig. 2, Cq). Considering that anti-Cqm1 antibody recognizes both Cqm1 and Aam1 with roughly similar intensities, based on the preliminary assays using the recombinant proteins (Fig. 1C), and since equivalent loads of BBMF samples were used for the blots (Fig. 2), these results are consistent with Aam1 being expressed at equivalent or increased levels, compared to Cqm1.

3.4. α -glucosidase assays

In gel enzymatic assays were performed to evaluate the presence of α -glucosidase catalytic bands in BBMF samples. Under semi-denaturing conditions *Ae. aegypti* BBMF resolved into four main catalytic bands while the same pattern was observed for *C. quinquefasciatus* BBMF samples, with the difference that *Ae. aegypti* proteins seemed to migrate with slower mobility (Fig. 3A). Immunoblotting of these proteins revealed a single *Ae. aegypti* catalytic band recognized by the anti-Cqm1 antiserum, as observed for *C. quinquefasciatus*, indicating that this band corresponded to the Aam1 orthologue (Fig. 3B). Migration of Cqm1 showed an apparent molecular weight of 82-kDa under semi-denaturing conditions,

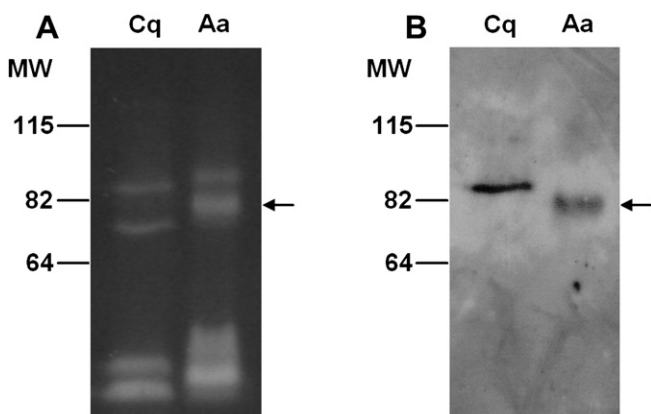


Fig. 3. *In gel* α -glucosidase assay of midgut brush border proteins from *Culex quinquefasciatus* (Cq) and *Aedes aegypti* (Aa) larvae separated on 8% semi-denaturing SDS-PAGE. (A) *In gel* α -glucosidase assay with bands indicating substrate cleavage, visualized under a UV transilluminator. (B) Immunoblotting of the samples shown in (A) with an anti-Cqm1 antibody. Arrows indicate the Aam1 protein. MW, molecular markers in kDa.

instead of the 66-kDa observed in denaturing SDS-PAGE which was in agreement with the weight predicted according to its sequence. In contrast, Aam1 has a predicted sequence of 66.8 kDa and migrates as a \approx 73-kDa protein in SDS-PAGE, while it is smaller than Cqm1 under semi-denaturing conditions.

3.5. Detection of Aam1 GPI anchor

Ae. aegypti BBMF samples were then treated with PI-PLC to determine if Aam1 is a GPI-anchored protein. Following treatment, the BBMF-bound (pellet) or released proteins (supernatant) were assayed for α -glucosidase activity. Whilst most α -glucosidase activity remained bound to the membrane fraction prior to treatment, a significant part of this activity was solubilized upon incubation with the enzyme and displaced to the supernatant (Fig. 4A). Immunoblotting showed that in untreated samples most of Aam1 was found to be present in membrane fractions, while after treatment it was displaced to the supernatant (Fig. 4B), confirming that it is a GPI-anchored protein.

3.6. Interaction assay between Aam1 and BinB

The presence of the putative Aam1 receptor as a midgut membrane bound α -glucosidase in *Ae. aegypti* larvae raised the question of whether it is able to bind to BinB subunit of Bin toxin. To address this, solubilized protein samples from *Ae. aegypti* and *C. quinquefasciatus* BBMF's (CHAPS-extracts) were evaluated through pull-down assays using the BinB-GST subunit expressed and purified from *E. coli*. Native Cqm1 from *C. quinquefasciatus* CHAPS-extracts specifically bound to BinB, as expected, whilst no protein bound to the GST control only (Fig. 5A). In contrast, no specific binding of Aam1 to the BinB was detected, despite its availability within the *Ae. aegypti* CHAPS-extract (Fig. 5B). Cqm1 45-kDa protein produced in *E. coli* was also evaluated through pull down assays, however, it did not provide conclusive data since this protein did not show a pattern of specific binding to BinB subunit (data not shown). It is possible that the truncated proteins from *E. coli* did not display adequate folding to be evaluated in terms of functionality to bind to Bin toxin. Complementary assays performed in this study showed that native Cqm1 protein loses its ability to bind to BinB toxin after being denatured by thermal inactivation, reinforcing the role of protein folding for this feature (Supplementary Fig. 2).

3.7. Effect of deglycosylation on Aam1 and Cqm1

The molecular weight observed for native Aam1 contrasts with the predicted weight based on its sequence and is indicative of post-translation modifications, such as glycosylation. To investigate this possibility, *Ae. aegypti* and *C. quinquefasciatus* CHAPS-extracts were submitted to treatment with two endoglycosidases. After incubation with PNGase F, Cqm1 resulted in a 66-kDa-protein identical in size to the non-treated control, indicating a lack of carbohydrate removal from the native protein (Fig. 6A, T). In contrast, PNGase F treatment of Aam1 resulted in a protein about 5-kDa smaller, consistent with the removal of oligosaccharides from the polypeptide chain (Fig. 6B, T). A similar treatment with the Endo H endoglycosidase did not display any effect on either Cqm1 or Aam1 proteins from CHAPS-extracts (data not shown). Results are consistent with Aam1, but not Cqm1 being specifically glycosylated. A search for possible glycosylation sites present in the Aam1 but missing from its orthologues in *Culex* identified a single site, between residues 310 and 312 (310 NRT 312), which could be the target for the glycosylation observed. Treated CHAPS-extracts were then used in pull down assays to investigate any effect of the

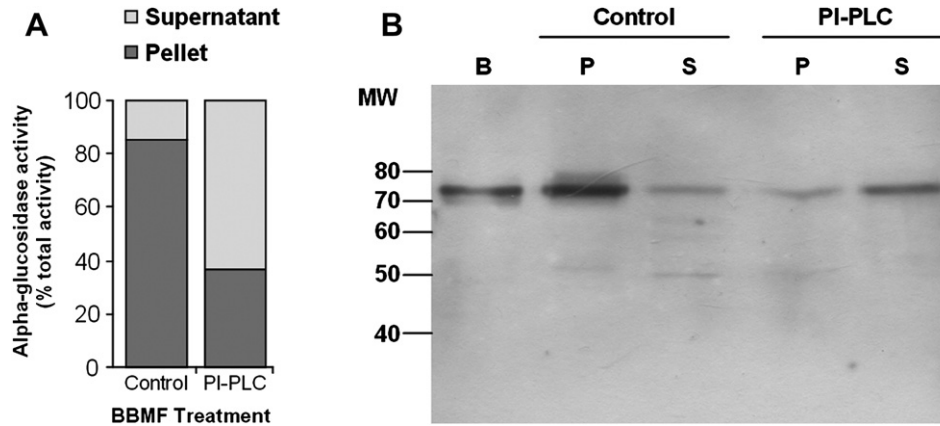


Fig. 4. Analysis of midgut brush border proteins from *Aedes aegypti* larvae after PI-PLC treatment. (A) Release of α -glucosidase activity in pellets (P) and supernatants (S) of PI-PLC-treated and non-treated samples. (B) Immunoblotting of pellets and supernatants from samples showed in A with an anti-Cqm1 antibody. B. Non-treated sample of midgut brush border proteins. MW, molecular markers in kDa.

deglycosylation on the interaction with the Bin toxin. No changes of binding properties to BinB were observed, Cqm1 still bound specifically to this subunit (Fig. 6A, T1) whilst no binding was observed for Aam1, before or after PNGase treatment (Fig. 6B, T1).

4. Discussion

Identification within the genome of *Ae. aegypti*, of a gene encoding an orthologue highly similar in sequence to the Bin toxin receptor from *Culex* sp. and *An. gambiae* (Darboux et al., 2001; Romão et al., 2006; Opota et al., 2008) contrasts with the failure of Bin toxin to specifically bind to the midgut of larvae from this species. Appropriate midgut proteolytic processing of the toxin and availability of functional binding sites has been claimed as key aspects for insect susceptibility to such toxins, but failure of midgut processing has been ruled out as the reason for the refractoriness of *Ae. aegypti* larvae to Bin, as well as to the Cry48Aa/Cry49Aa toxin from *B. sphaericus* strain IAB59, whose activity is also restricted to *Culex* (Nielsen-LeRoux and Charles, 1992; Jones et al., 2008). This study shows that a closely related orthologue to the Bin toxin receptors previously described from *C. pipiens* (Cpm1), *C. quinquefasciatus* (Cqm1) and *An. gambiae* (Agm3) (Darboux et al., 2001; Romão et al., 2006; Opota et al., 2008) is expressed in *Ae. aegypti*

midgut larvae as a GPI-anchored protein. Previous studies reported α -glucosidases that can be stage-specific or expressed as soluble, instead of membrane-bound proteins (Darboux et al., 2002; Romão et al., 2006; Souza-Neto et al., 2007). The finding from our study rules out lack of expression of the receptor in larval stages, or its expression as a soluble protein, as a possible reason behind the refractoriness observed in *Ae. aegypti*.

α -glucosidases belong to the larger family of α -amylases which are responsible for catalyzing the hydrolysis of glycosidic linkage of oligosaccharides (Terra and Ferreira, 1994; Janecek, 1997). Aam1 is part of the set of membrane-bound α -glucosidases that play essential physiological roles for carbohydrate digestion in *A. aegypti* larvae. Cpm1, Cqm1 and Agm3, orthologues from *C. pipiens*, *C. quinquefasciatus* and *An. gambiae* larva respectively, have been shown to be highly conserved and constitutively expressed in larvae and, as well as performing their enzymatic role essential for the insect survival, also act as specific receptors for the Bin toxin (Silva-Filha et al., 1999; Romão et al., 2006; Opota et al., 2008). Expression at adequate concentrations and life stages and localization on the epithelium surface are features which Aam1 shares with Cpm1, Cqm1 and Agm3, nevertheless, affinity assays have previously demonstrated that Bin toxin does not bind to *Ae. aegypti* BBMF (Nielsen-LeRoux and Charles, 1992), which is corroborated by

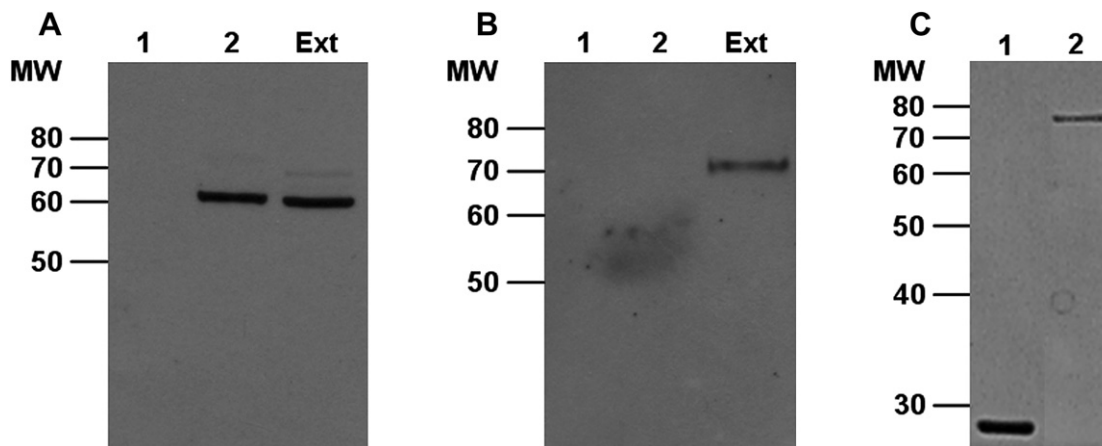


Fig. 5. Interaction of solubilized midgut brush border proteins (CHAPS-extracts) from *Culex quinquefasciatus* (A) and *Aedes aegypti* (B) larvae with the BinB toxin subunit, evaluated through pull down assay. CHAPS-extracts were incubated with GST (1) or BinB-GST (2) immobilized on beads. Bound proteins were separated on 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and submitted to immunodetection with an anti-Cqm1 antibody. Ext: CHAPS-extracts sample without incubation with GST or BinB-GST beads. (C) GST (1) and BinB-GST (2) proteins immobilized on beads are shown in a Coomassie-stained gel. MW, molecular weight markers in kDa.

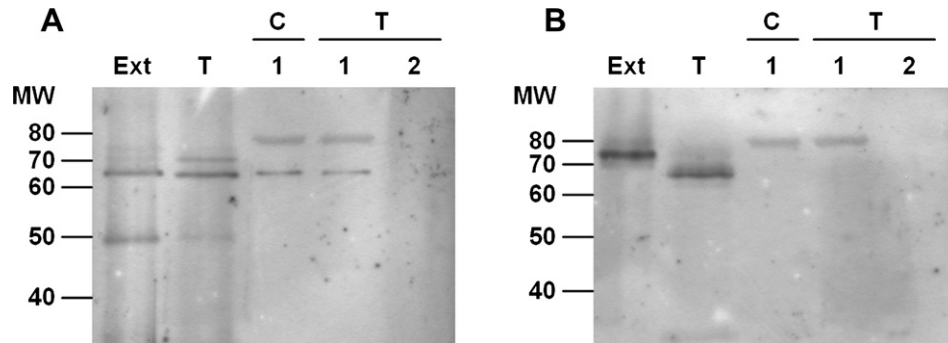


Fig. 6. Effect of PNGase F endoglycosidase treatment on midgut proteins (CHAPS-extracts) from *Culex quinquefasciatus* (A) and *Aedes aegypti* (B) larvae and on their capacity to interact with the BinB toxin subunit, through pull down assay. Native CHAPS-extracts were treated with PNGase and incubated with BinB-GST (1) or GST (2) immobilized on beads. Bound proteins were separated on 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and immunodetected with an anti-Cqm1 antibody. Ext: native CHAPS-extracts; C: non treated CHAPS-extracts; T: treated CHAPS-extracts; BinB-GST and GST proteins immobilized on beads in Coomassie-stained gels are shown in Fig. 5C. MW, molecular weight markers in kDa.

this work in which native Aam1 did not bind to recombinant BinB subunit in pull-down assays.

Protein glycosylation was investigated since this is one of the most abundant post-translational modification of eukaryotic proteins and one which can affect features such as enzyme activity, receptor recognition and protein stability and structure (Varki, 1993). N-linked oligosaccharides, in particular N-acetylgalactosamine (GalNac) from aminopeptidases and alkaline phosphatases that act as receptors in lepidopteran species, are needed for the binding of some Cry toxins (Knowles et al., 1991; Denolf et al., 1997; Jurat-Fuentes et al., 2004; Pardo-Lopez et al., 2006). Cases of insect and nematode resistance to Cry toxins were found to be related to altered glycosylation of microvillar proteins involved in binding (Griffitts et al., 2001, 2003, 2005). Here, we have shown that Aam1 is glycosylated, unlike Cqm1 and despite of the two N-glycosylation signals predicted in the *Culex* sequences (Darboux et al., 2001; Romão et al., 2006; Opota et al., 2008). Carbohydrate removal from Aam1 did not affect its binding properties suggesting that differential glycosylation of this protein is not interfering with potential toxin binding sites. Nevertheless, it is still possible that changes in protein folding originally induced by the glycosylation event, and which would presumably interfere with the Bin toxin binding epitope, are maintained after deglycosylation (Shental-Bechor and Levy, 2008). This would also explain why deglycosylated Aam1 still did not bind to the BinB. As described, glycosylation of insect midgut microvillar proteins seems to have a relevant role to determine susceptibility to Cry toxins, however, while N-glycosylations of some receptors are crucial for the binding and consequently to their susceptibility to certain toxins, there are cases in which toxin binding to receptors do not depend on those linked sugars (Jurat-Fuentes and Adang, 2004; Perera et al., 2009). Regarding the binding of functional receptors to the Bin toxin in culicid species, data from this study suggest that N-linked sugars are not involved in receptor recognition. Although speculative, it could not be excluded that Aam1 glycosylation could prevent the access to Bin toxin epitopes in Aam1. Previous studies of pathogenesis processes have show that glycosylation motifs can hide epitopes, in receptor molecules which are recognized by pathogen (Varki, 1993; Chabot et al., 2000).

The possibility remains that discrete differences in amino acid sequence between Aam1 and related orthologues, which would supposedly change the sequence of the not yet identified toxin binding or conformational epitope, might be the sole reason behind the lack of binding of Bin toxin to this α -glucosidase. Nevertheless differences in folding, which, as stated above, could be induced by the glycosylation event or another factor, might still be the major reason behind the binding differences. The apparent molecular weight of 80-kDa displayed by Cqm1 under semi-denaturing conditions,

higher than observed when the protein is denatured, associated with evidence that denatured Cqm1 lacks functionality to bind to BinB, suggest substantial conformational differences between Cqm1 and Aam1 or differential binding to a yet undescribed protein partner. Binding of Btr175 cadherin from *Bombix mori* to Cry1Ac toxin, similarly to Cqm1, was shown to be disrupted by denaturation, while the characterization of most receptors by ligand-blot assays is based on binding to denatured BMMF proteins (Nagamatsu et al., 1998). Further investigation of Cqm1 and Aam1 proteins produced in appropriate expression system needs to be performed to clarify this aspect. The results presented here confirm that this group of orthologue proteins constitutes an interesting model to understand the molecular determinants that allow midgut surface proteins to be target sites for insecticides, a knowledge which could help develop approaches to improve those and other molecules in the future.

Acknowledgments

We thank the team from the insectarium of the Department of Entomology (CPqAM-FIOCRUZ) for the technical support, the Program for Technological Development in Tools for Health PDTIS-FIOCRUZ for using its facilities. This study was supported by the Brazilian funding agencies Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq Brazil, grant 471911/2006-2) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE Brazil, grant APQ 0427-2.13/08).

Appendix. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at doi:10.1016/j.ibmb.2010.05.007.

References

- Armengol, G., Hernandez, J., Velez, J.G., Orduz, S., 2006. Long-lasting effects of a *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* experimental tablet formulation for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) control. *J. Econ. Entomol.* 99, 1590–1595.
- Baumann, L., Broadwell, A.H., Baumann, P., 1988. Sequence analysis of the mosquitoicidal toxin genes encoding 51.4- and 41.9-kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. *J. Bacteriol.* 170, 2045–2050.
- Baumann, P., Unterman, B.M., Baumann, L., Broadwell, A.H., Abbene, S.J., Bowditch, R.D., 1985. Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. *J. Bacteriol.* 163, 738–747.
- Bourgouin, C., Delecluse, A., de la Torre, F., Szulmajster, J., 1990. Transfer of the toxin protein genes of *Bacillus sphaericus* into *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and their expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 340–344.
- Broadwell, A.H., Baumann, P., 1987. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1333–1337.

- Chabot, D.J., Chen, H., Dimitrov, D.S., Broder, C.C., 2000. N-linked glycosylation of CXCR4 masks coreceptor function for CCR5-dependent human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J. Virol.* 74, 4404–4413.
- Charles, J.F., 1987. Ultrastructural midgut events in Culicidae larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spore/crystal complex. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 138, 471–484.
- Charles, J.F., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Humphreys, M.J., Berry, C., 1997. Binding of the 51- and 42-kDa individual components from the *Bacillus sphaericus* crystal toxin to mosquito larval midgut membranes from *Culex* and *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae). *FEMS Microbiol. Lett.* 156, 153–159.
- Darboux, I., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., Pauron, D., 2001. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 981–990.
- Darboux, I., Pauchet, Y., Castella, C., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., Pauron, D., 2002. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 5830–5835.
- de Melo, J.V., Vasconcelos, R.H., Furtado, A.F., Peixoto, C.A., Silva-Filha, M.H., 2008. Ultrastructural analysis of midgut cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*. *Micron* 39, 1342–1350.
- de Melo Neto, O.P., Standart, N., Martins de Sa, C., 1995. Autoregulation of poly(A)-binding protein synthesis in vitro. *Nucleic Acids Res.* 23, 2198–2205.
- Denolf, P., Hendrickx, K., Van Damme, J., Jansens, S., Peferoen, M., Degheele, D., Van Rie, J., 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, 748–761.
- Dhalia, R., Reis, C.R., Freire, E.R., Rocha, P.O., Katz, R., Muniz, J.R., Standart, N., de Melo Neto, O.P., 2005. Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Mol. Biochem. Parasitol.* 140, 23–41.
- Griffitts, J.S., et al., 2005. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science* 307, 922–925.
- Griffitts, J.S., et al., 2003. Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions. *J. Biol. Chem.* 278, 45594–45602.
- Griffitts, J.S., Whitacre, J.L., Stevens, D.E., Aroian, R.V., 2001. Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. *Science* 293, 860–864.
- Janecek, S., 1997. alpha-Amylase family: molecular biology and evolution. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 67, 67–97.
- Jones, G.W., Wirth, M.C., Monnerat, R.G., Berry, C., 2008. The Cry48Aa-Cry49Aa binary toxin from *Bacillus sphaericus* exhibits highly restricted target specificity. *Environ. Microbiol.* 10, 2418–2424.
- 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., Gahan, L.J., Gould, F.L., Heckel, D.G., Adang, M.J., 2004. The HevCaLP protein mediates binding specificity of the Cry1A class of *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Biochemistry* 43, 14299–14305.
- Knowles, B.H., Knight, P.J., Ellar, D.J., 1991. N-acetyl galactosamine is part of the receptor in insect gut epithelia that recognizes an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Biol. Sci.* 245, 31–35.
- Lacey, L.A., 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety israelensis and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23, 133–163.
- Lee, Y.W., Zairi, J., 2006. Field evaluation of *Bacillus thuringiensis* H-14 against *Aedes* mosquitoes. *Trop. Biomed.* 23, 37–44.
- Nagamatsu, Y., Toda, S., Koike, T., Miyoshi, Y., Shigematsu, S., Kogure, M., 1998. Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 727–734.
- Nene, V., et al., 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* 316, 1718–1723.
- Nicolas, L., Nielsen-Leroux, C., Charles, J.F., Delecluse, A., 1993. Respective role of the 42- and 51-kDa components of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 106, 275–280.
- Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 1992. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. *Eur. J. Biochem.* 210, 585–590.
- Opota, O., Charles, J.F., Warot, S., Pauron, D., Darboux, I., 2008. Identification and characterization of the receptor for the *Bacillus sphaericus* binary toxin in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 149, 419–427.
- Pardo-Lopez, L., Gomez, I., Rausell, C., Sanchez, J., Soberon, M., Bravo, A., 2006. Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. *Biochemistry* 45, 10329–10336.
- Pauchet, Y., Luton, F., Castella, C., Charles, J.F., Romey, G., Pauron, D., 2005. Effects of a mosquitocidal toxin on a mammalian epithelial cell line expressing its target receptor. *Cell. Microbiol.* 7, 1335–1344.
- Perera, O.P., Willis, J.D., Adang, M.J., Jurat-Fuentes, J.L., 2009. Cloning and characterization of the Cry1Ac-binding alkaline phosphatase (HvALP) from *Heliothis virescens*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 294–302.
- Regis, L., et al., 2008. Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 50–59.
- Regis, L., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 2001. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends Parasitol.* 17, 377–380.
- Romão, T.P., de Melo Chalegre, K.D., Key, S., Ayres, C.F., Fontes de Oliveira, C.M., de Melo-Neto, O.P., Silva-Filha, M.H., 2006. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its alpha-glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. *FEBS J.* 273, 1556–1568.
- Shental-Bechor, D., Levy, Y., 2008. Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 8256–8261.
- Silva-Filha, M.H., Nielsen-Leroux, C., Charles, J.F., 1997. Binding kinetics of *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush-border membranes of *Anopheles* and *Culex* sp. mosquito larvae. *Eur. J. Biochem.* 247, 754–761.
- Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 1999. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 711–721.
- Singh, G.J., Gill, S.S., 1988. An electron microscope study of the toxic action of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 52, 237–247.
- Souza-Neto, J.A., Machado, F.P., Lima, J.B., Valle, D., Ribolla, P.E., 2007. Sugar digestion in mosquitoes: identification and characterization of three midgut alpha-glucosidases of the neo-tropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 147, 993–1000.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 109B, 1–62.
- Varki, A., 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3, 97–130.

6.2 Resultados complementares ao artigo 1

Dentre as diferenças existentes entre as proteínas Cqm1 e Aam1, Ferreira et al. (2010) demonstraram que ambas apresentam sítios preditos de N-glicosilação, no entanto, somente a primeira demonstrou ser glicosilada *in vivo*. Tal fato foi verificado pelo tratamento das proteínas com a endoglicosidase PNGase F, que demonstrou a presença de carboidratos na Aam1, mas não na proteína Cqm1. Após a remoção de carboidratos da Aam1 pelo tratamento com a PNGase F, esta proteína permaneceu incapaz de interagir com a toxina Bin. No estudo de Ferreira et al. (2010) a remoção das glicosilações foi feita a partir de proteínas nativas já processadas, após o correto dobramento durante a tradução da proteína. É possível que a remoção de carboidratos, sob estas condições, não interfira na funcionalidade das proteínas, pois a estrutura protéica seria mantida. Para investigar tal hipótese foi necessário produzir proteínas sem glicosilações desde a tradução, através da produção de proteínas mutantes em sítios de glicosilação. A avaliação das glicosilações é de grande relevância no contexto desse estudo, visto que essa foi a diferença mais marcante encontrada entre as proteínas Cqm1 e Aam1. Os dados apresentados nesta seção, relativos à análise de proteínas mutantes em sítios de glicosilação, fazem parte da monografia de conclusão de curso da bióloga Nathaly Alexandre do Nascimento, que está inserida no âmbito deste projeto de doutorado.

6.2.1 Análises *in silico* de modificações pós-traducionais

A análise *in silico* de modificações pós-traducionais das proteínas Cqm1 e Aam1 mostrou que a proteína Cqm1 apresenta em sua sequência três sítios preditos de N-glicosilação, enquanto a Aam1 apresenta seis, com diferentes potenciais. Dois desses sítios são comuns para as duas proteínas, um sítio é exclusivo na Cqm1 e quatro são exclusivos da Aam1 (Tabela 2). As análises não revelaram sítios de O-glicosilação nestas proteínas. Na análise dos sítios de fosforilação verificou-se que a Cqm1 possui 30 sítios e a Aam1 34, sendo sete sítios exclusivos da Cqm1 e quatro da Aam1 (Tabela 3). Os dados prévios demonstraram diferenças marcantes em termos de glicosilação entre as proteínas nativas Cqm1 e Aam1 e, como tais modificações podem estar intimamente relacionadas à funcionalidade de proteínas, foi realizada uma análise *in vitro* das glicosilações nas proteínas Cqm1 e Aam1, produzidas sob a forma recombinante. Devido ao tempo requerido para a produção de proteínas recombinantes não foi possível analisar os sítios de fosforilação diferenciais destas proteínas.

Tabela 2 - Sítios potenciais de N-glicosilação das proteínas Cqm1 e Aam1, determinados através do programa NetNGly 1.0.

Cqm1			Aam1		
Sítio	Posição	Potencial de glicosilação	Sítio	Posição	Potencial de glicosilação
1	¹⁰² NLT ¹⁰⁴	+++	1	¹²⁶ NHS ¹²⁸	+
2	¹²⁷ NHS ¹²⁹	+	2	¹⁴² NET ¹⁴⁴	-
3	⁴¹⁰ NRT ⁴¹²	---	3	³¹⁰ NRT ³¹²	++
			4	⁴¹⁴ NRT ⁴¹⁶	---
			5	⁴³¹ NAT ⁴³³	-
			6	⁵³³ NST ⁵³⁵	-

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3 - Sítios potenciais de fosforilação das proteínas Cqm1 e Aam1, determinados através do programa NetPhos 2.0.

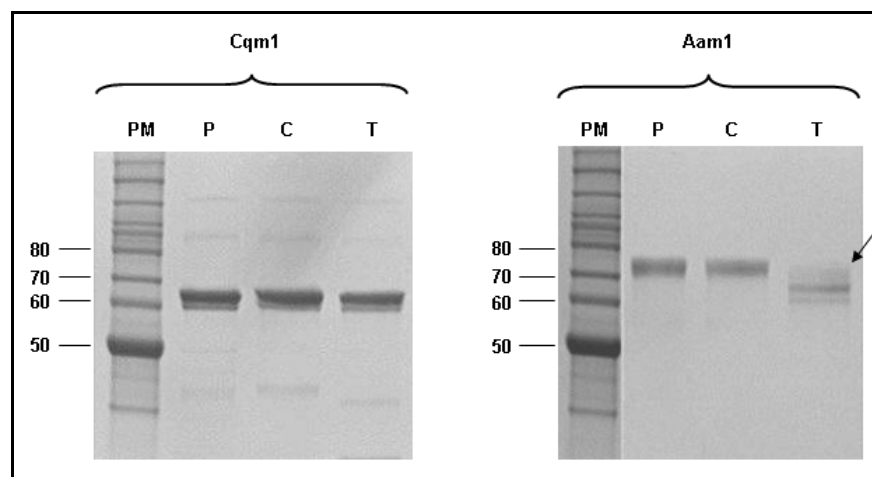
Cqm1		Aam1	
Posição	Aminoácido	Posição	Aminoácido
27*	S	42	S
47	S	46	S
113*	S	62*	S
129	S	80	S
241	S	128	S
278	S	138	S
293	S	245	S
294	S	282	S
335*	S	297	S
351	S	298	S
356	S	355	S
360*	S	429	S
364	S	466	S
419*	S	560	S
59	T	58	T
207	T	144*	T
349	T	179	T
508*	T	261	T
31	Y	353	T
88	Y	407*	T
94	Y	465	T
100	Y	30	Y
146	Y	87	Y
150	Y	93	Y
197	Y	145	Y
249	Y	149	Y
277	Y	201	Y
302	Y	253	Y
438	Y	268	Y
474*	Y	281	Y
		296	Y
		306	Y
		402*	Y
		442	Y

Fonte: Elaborada pela autora**Nota:** * Sítios exclusivos

6.2.2 Padrão de glicosilação das proteínas recombinantes

O padrão de glicosilação foi avaliado a partir de amostras de proteínas Cqm1 e Aam1 purificadas em resina de níquel e tratadas com a enzima PNGase F. As proteínas Cqm1 (61 kDa) e Aam1 (77 kDa) selvagens apresentaram pesos moleculares estimados de 61 e 64 kDa, respectivamente, após o tratamento com a PNGase F (Figura 8). Esse resultado corrobora os dados obtidos para as proteínas nativas, que mostram a ausência aparente de glicosilações na Cqm1, enquanto a Aam1 apresenta carboidratos na sua sequência, visto que houve uma redução no peso molecular da Aam1 tratada (64 kDa) em relação à proteína não tratada (77 kDa).

Figura 8 - Tratamento das proteínas recombinantes Cqm1 e Aam1 com a endoglicosidase PNGase F.



Fonte: Elaborada pela autora.

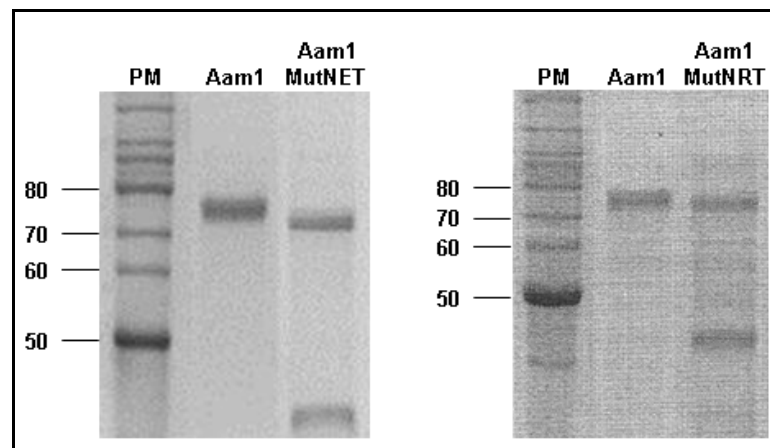
Nota: As amostras foram incubadas a 37 °C, separadas em SDS-PAGE 10%, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e submetidas a imunodeteção com o anticorpo anti-Cqm1, que reconhece ambas as proteínas com a mesma eficiência. P. Proteína controle sem incubação; C. Controle negativo incubado a 37°C sem PNGase F. T. Proteína tratada com PNGase F; Seta indica a redução do peso molecular da Aam1 após o tratamento. PM. Marcador de peso molecular em kDa.

6.2.3 Análise das proteínas Aam1 modificadas em sítios de N-glicosilação

Foram produzidas proteínas Aam1 modificadas nos sítios de glicosilação $_{126}\text{NHS}_{128}$ (Aam1_MutNHS), $_{142}\text{NET}_{144}$ (Aam1_MutNET) e $_{310}\text{NRT}_{312}$ (Aam1_MutNRT). Nestas foi feita a substituição por uma trinca de alaninas ou pelos aminoácidos presentes na posição correspondente da Cqm1, respectivamente. A proteína Aam1_MutNHS não foi expressa nas células Sf9, após inúmeras tentativas, por razões desconhecidas. As proteínas Aam1_MutNET

e Aam1_MutNRT apresentaram massas moleculares de $\cong 72$ e $\cong 74$ kDa, respectivamente, o que representa uma redução aproximada de 5 e 3 kDa, respectivamente, em relação à proteína selvagem, que possui $\cong 77$ kDa (Figura 9). Após o tratamento destas proteínas mutantes com a enzima PNGase F, houve uma redução de peso molecular, indicando que ainda existem carboidratos remanescentes em outros sítios de glicosilação em cada proteína analisada (dados não apresentados). A avaliação da funcionalidade revelou que, apesar da remoção de carboidratos, as proteínas mutantes nestes sítios permanecem incapazes de interagir com a toxina Bin (Figura 10). Os dados obtidos demonstram que ocorre a inserção de carboidratos nos sítios avaliados da proteína Aam1, entretanto, estes não exercem um papel na funcionalidade.

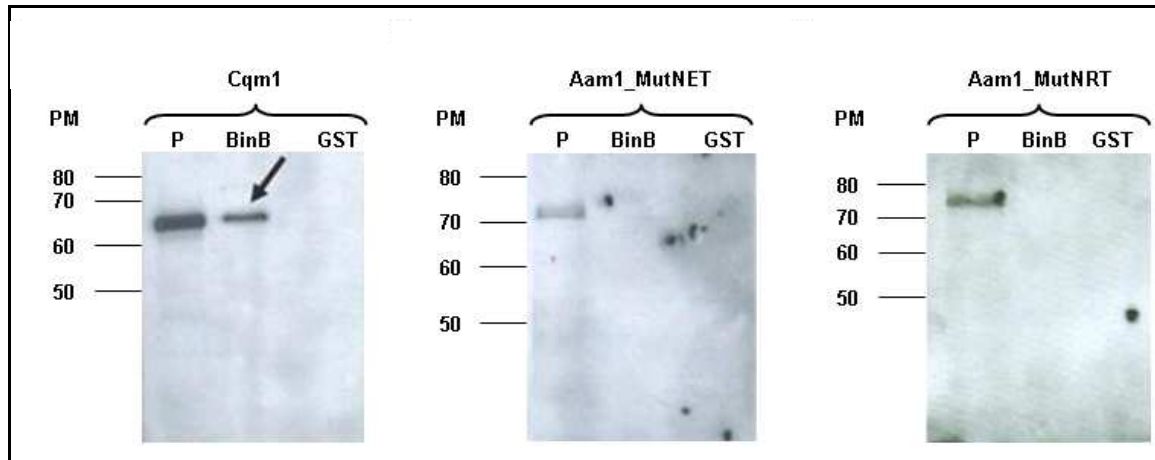
Figura 9 - Perfil eletroforético das proteínas Aam1, Aam1_MutNET e Aam1_MutNRT produzidas em células Sf9.



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: As proteínas foram separadas em SDS-PAGE a 10% e coradas com azul de Coomassie. PM. Marcador de peso molecular em kDa.

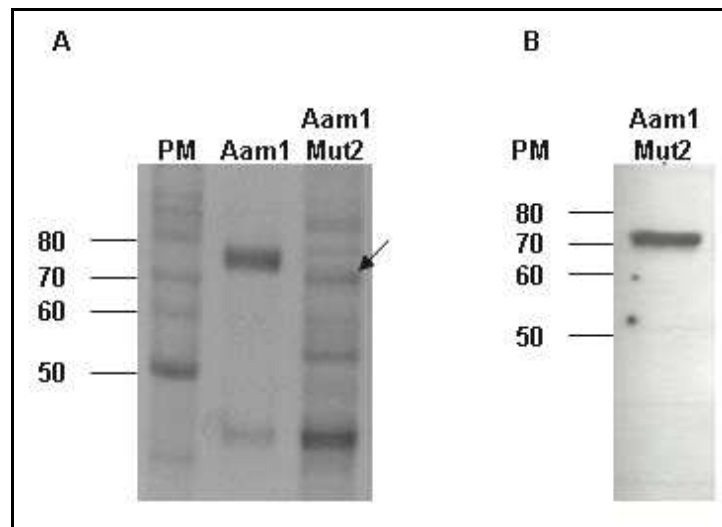
Figura 10 - Ensaio de *pull-down* para avaliar a ligação das proteínas Cqm1, Aam1_MutNET e Aam1_MutNRT com a toxina BinB (BinB).



Fonte: Elaborada pela autora.

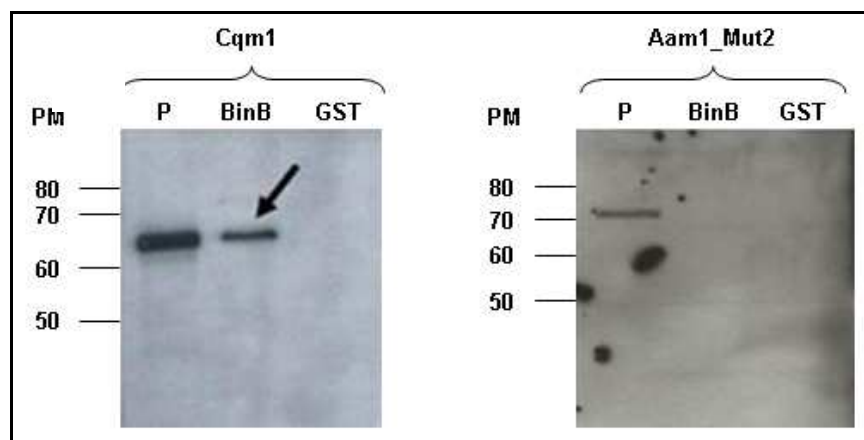
Nota: As amostras foram incubadas com a BinB ou a proteína glutationa-S-transferase (GST, controle negativo) imobilizadas em resina, separadas em SDS-PAGE 10%, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e submetida à imunodeteção com anticorpo anti-Cqm1. P. Proteína controle não incubada com as resinas BinB ou GST. Seta indica a ligação específica da proteína Cqm1 com a subunidade BinB da toxina. PM. Marcador de peso molecular em kDa.

O efeito da associação da mutagênese desses sítios foi verificado. Foi produzida uma proteína mutante em ambos os sítios de glicosilação (Aam1_Mut2), que apresentou uma redução do peso molecular para 70 kDa, em relação à proteína Aam1 selvagem (Figura 11). A associação das mutações não influenciou a capacidade de interação com a toxina Bin, pois a Aam1_Mut2 não foi capaz de ligar a este componente (Figura 12). Os dados indicam que uma maior remoção de carboidratos da Aam1 também não interferiu na capacidade de ligação à toxina Bin. O tratamento deste mutante com a PNGase F confirmou que após a modificação desses dois sítios, ainda restaram carboidratos na molécula (dados não apresentados).

Figura 11 - Perfil eletroforético das proteínas Aam1 selvagem e Aam1_Mut2 produzidas em células Sf9

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: As proteínas foram separadas em SDS-PAGE a 10% e coradas com azul de Coomassie (A) ou imunodetectada com o anticorpo anti-Cqm1/Aam1 (B). Seta indica a banda correspondente à proteína Aam1_Mut2. PM. Marcador de peso molecular em kDa.

Figura 12 - Ensaio de *pull-down* para avaliar a ligação das proteínas Cqm1 e Aam1_Mut2 com a toxina BinB

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: As amostras foram incubadas com a BinB ou a proteína glutationa-S-transferase (GST, controle negativo) imobilizadas em resina, separadas em SDS-PAGE 10%, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e submetida à imunodeteção com anticorpo anti-Cqm1. P. Proteína controle não incubada com as resinas BinB ou GST. Seta indica a ligação específica da proteína Cqm1 com a subunidade BinB da toxina. BinB. Subunidade BinB da toxina. PM. Marcador de peso molecular em kDa.

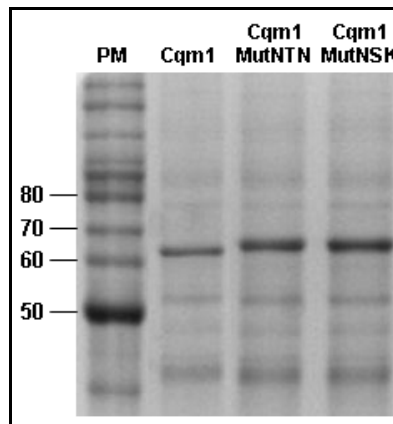
6.2.4 Análise das proteínas Cqm1 modificadas em sítios de N-glicosilação

Apesar da Aam1 possuir seis sítios de glicosilação, apenas dois deles foram analisados devido a dificuldades de expressar as proteínas com mutações em todos os sítios preditos. A produção de proteínas em quantidade abundante no sistema Sf9 é um processo relativamente lento. Diante disso, foi realizada uma abordagem que consistiu na obtenção de proteínas

Cqm1 mutantes nas posições correspondentes aos sítios 5 e 6, que não foram analisados na Aam1: Cqm1_MutNTN e Cqm1_MutNSK. Como a Cqm1 selvagem tem capacidade de ligação à toxina Bin, os resultados de intervenções feitas diretamente nesta proteína poderiam ser mais elucidativos. Naquelas posições foram inseridos os aminoácidos que sinalizam os sítios de glicosilação na Aam1.

As proteínas Cqm1_MutNTN e Cqm1_MutNSK apresentaram um aumento de cerca de 3 kDa no peso molecular (Figura 13), indicando que estes sítios de glicosilação preditos de Aam1, quando inseridos na proteína Cqm1, sinalizaram a inserção de glicanos. O tratamento das proteínas mutantes com a enzima PNGase F, confirmou que houve a inserção de carboidratos, pois observou-se uma redução de cerca de 3 kDa nas proteínas mutantes tratadas (dados não apresentados). A avaliação da capacidade de ligação à toxina Bin revelou que após a adição de carboidratos na Cqm1, as proteínas Cqm1 mutantes permaneceram capazes de interagir com a toxina Bin (Figura 14). Esses dados sugerem fortemente que na Aam1 esses sítios possuem carboidratos.

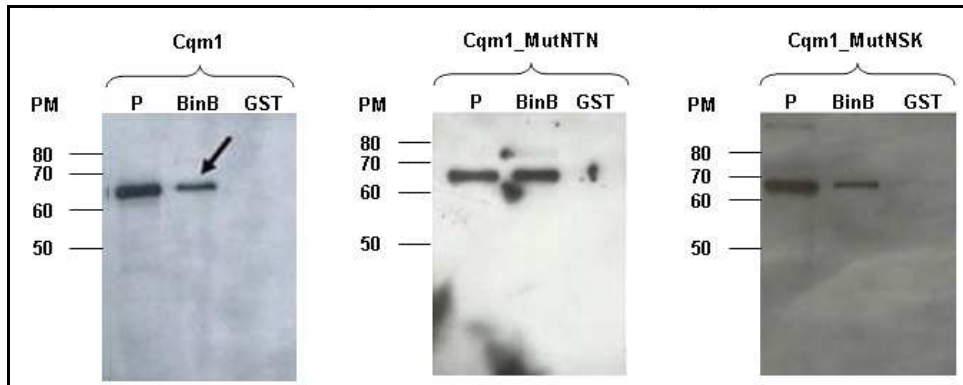
Figura 13 - Perfil eletroforético das proteínas mutantes Cqm1 (Cqm1 mutante que apresenta o mesmo peso molecular da Cqm1 selvagem), Cqm1_MutNTN e Cqm1_MutNSK, produzida em células Sf9.



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: As proteínas foram separadas em SDS-PAGE a 10% e coradas com azul de Coomassie. PM. Marcador de peso molecular em kDa.

Figura 14 - Ensaio de *pull-down* para avaliar a ligação das proteínas Cqm1, Cqm1_MutNTN e Cqm1_MutNSK com a toxina BinB (BinB).



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: As amostras foram incubadas com a BinB ou a proteína glutationa-S-transferase (GST, controle negativo) imobilizadas em resina, separadas em SDS-PAGE 10%, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e submetida à imunodeteção com anticorpo anti-Cqm1. P. Proteína controle não incubada com as resinas BinB ou GST. Seta indica a ligação específica da proteína Cqm1 com a subunidade BinB da toxina. PM. Marcador de peso molecular em kDa.

6.3 Sumário do artigo 1 e resultados complementares

- a) A proteína Aam1 é expressa no *microvilli* intestinal das larvas de *A. aegypti*, de forma similar à proteína Cqm1 de *C. quinquefasciatus*, e foi detectada nas fases larvária e adulta. Duas proteínas parálogas também foram detectadas e apresentam expressão estágio-específica na fase adulta;
- b) A refratariedade de *Ae. aegypti* à toxina Bin parece ser decorrente da presença de diferenças entre as proteínas Aam1 e Cqm1, que tornam a Aam1 incapaz de interagir com a toxina Bin;
- c) As proteínas Cqm1 e Aam1 possuem uma diferença marcante de glicosilações, visto que a Cqm1 não parece ser glicosilada e a Aam1 apresenta glicanos inseridos na cadeia polipeptídica. Uma análise preliminar das glicosilações não foi conclusiva a respeito da sua influência na capacidade de ligação das proteínas à toxina Bin;
- d) A interação da Cqm1 com a toxina Bin depende da conformação nativa, não requerendo somente a sequência primária de aminoácidos, e as proteínas Cqm1 e Aam1 apresentam diferenças no seu enovelamento;

- e) A Cqm1 e a Aam1 apresentam sítios de N-glicosilação e fosforilação preditos nas suas sequências;
- f) As proteínas Cqm1 e Aam1 foram corretamente processadas no sistema de células Sf9, pois a Cqm1 apresentou capacidade de ligação à toxina Bin, indicando o correto enovelamento, e a Aam1 apresenta glicosilações, assegurando que modificações pós-traducionais foram inseridas corretamente;
- g) A proteína Cqm1, apesar de possuir sítios preditos de N-glicosilação, não possui glicanos inseridos na sua cadeia e a ligação à toxina Bin não depende deste fator;
- h) A proteína Aam1 possui seis sítios preditos de glicosilação e é glicosilada em pelo menos quatro deles. A presença destes carboidratos não parece ser a razão desta proteína não interagir com a toxina Bin;
- i) O papel da glicosilação da proteína Aam1 ainda é desconhecido e uma hipótese a ser investigada seria sua influência na atividade catalítica.

7 ARTIGO 2 - Non conserved residues between Cqm1 and Aam1 mosquito α -glucosidases are critical for the capacity of Cqm1 to bind the Binary (Bin) toxin from *Lysinibacillus sphaericus*

7.1 Apresentação e objetivos

Os resultados obtidos no artigo 1 revelaram que a α -glicosidase Aam1 é abundantemente expressa no *microvilli* intestinal das larvas de *Ae. aegypti* mas não possui capacidade de ligação à toxina Bin, confirmando esse evento como base da refratariedade dessa espécie a Lsp (FERREIRA et al., 2010). Os resultados complementares obtidos também revelaram que as diferenças no padrão de glicosilação entre Cqm1 e Aam1 possivelmente não estão implicadas na diferença de afinidade das proteínas pela toxina Bin. Dessa forma, surgiu a necessidade de investigar regiões e aminoácidos não conservados entre Cqm1 e Aam1, com o objetivo de identificar o epítipo de ligação da Cqm1 à toxina Bin e tentar elucidar a refratariedade de *Ae. aegypti*.

A primeira parte desta seção consiste no artigo FERREIRA et al., (submetido), no qual foi realizado um mapeamento de regiões e de aminoácidos da proteína Cqm1 que poderiam estar implicados na capacidade de interação com a toxina Bin. Foram produzidas proteínas quiméricas (Cqm1/Aam1) e Cqm1 mutantes, em pontos da sequência que diferem da Aam1, para determinar os epítopos de ligação da Cqm1 à toxina Bin. A investigação teve como base a análise das sequências das proteínas, dados obtidos na análise das proteínas mutantes em sítios de glicosilação, além da abordagem de modelagem das estruturas destas proteínas. Na segunda parte desta seção serão apresentados resultados complementares relativos à modelagem das proteínas Cqm1 e Aam1 selvagens e mutantes, na região correspondente à identificada como crítica para a interação da Cqm1 com a toxina Bin. Além disso, foi realizada a modelagem da proteína Cqm1 com uma deleção de 66 aminoácidos, assim como ocorre para a proteína Cqm1_{BP-del} que, devido à deleção, não funciona como receptor da toxina Bin. A modelagem destas proteínas poderia fornecer informações em relação às estruturas das moléculas, bem como às diferenças existentes entre elas.

Esta seção apresenta três objetivos, sendo que os objetivos 1 e 2 se referem ao artigo FERREIRA et al. (2014) e o objetivos 3 se refere à parte complementar, que está em fase de preparação. Os objetivos são os seguintes:

- a) Delimitar regiões da proteína Cqm1 responsáveis pela interação da toxina Bin;
- b) Identificar grupos específicos de aminoácidos que compõem os epítomos de ligação à toxina Bin;
- c) Realizar uma análise de modelagem *in silico* das proteínas Cqm1 e Aam1;

Artigo submetido

Insect Biochemistry and Molecular Biology

Non conserved residues between Cqm1 and Aam1 mosquito α -glucosidases are critical for the capacity of Cqm1 to bind the Binary (Bin) toxin from *Lysinibacillus sphaericus*

Lígia Maria Ferreira^a, Tatiany Patrícia Romão^a, Nathaly Alexandre do Nascimento^a, Maria da Conceição Mendes Ferreira da Costa^a, Antônio Mauro Rezende^b, Osvaldo Pompílio de-Melo-Neto^b, Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha^{a*}

^aDepartment of Entomology and ^bDepartment of Microbiology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife-PE 50670-420, Brazil

*** Corresponding author**

Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha

Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-420, Brazil

Tel: +55-81-21012553

Fax: +55-81-21012516

E-mail: mhneves@cpqam.fiocruz.br

ABSTRACT

The Binary (Bin) toxin from the entomopathogenic bacterium *Lysinibacillus sphaericus* acts on larvae of the culicid *Culex quinquefasciatus* through its binding to Cqm1, a midgut-bound α -glucosidase. Specific binding by the BinB subunit to the Cqm1 receptor is essential for toxicity however the toxin is unable to bind to the Cqm1 ortholog from the refractory species *Aedes aegypti* (Aam1). Here, to investigate the molecular basis for the interaction between Cqm1 and BinB, recombinant Cqm1 and Aam1 were first expressed as soluble forms in Sf9 cells. The two proteins were found to display the same glycosylation patterns and BinB binding properties as the native α -glucosidases. Chimeric constructs were then generated through the exchange of reciprocal fragments between the corresponding *Cqm1* and *Aam1* cDNAs. Subsequent expression and binding experiments defined a Cqm1 segment encompassing residues S129 and A312 as critical for the interaction with BinB. Through site directed mutagenesis experiments, replacing specific sets of residues from Cqm1 with those of Aam1, the $_{158}GG_{160}$ doublet was required for this interaction. Molecular modeling mapped these residues to an exposed loop within the Cqm1's structure, compatible with a target site for BinB and providing a possible explanation for its lack of binding to Aam1.

Key words: *Culex quinquefasciatus*; *Aedes aegypti*; biolarvicides; orthologs; receptor; binding sites.

1. Introduction

The entomopathogenic bacterium *Lysinibacillus sphaericus* is a commonly used biolarvicide which exhibits high larvicidal activity against culicid mosquito species and has been used worldwide to control *Culex* and *Anopheles* spp., major vectors of a number of human pathogens (Lacey, 2007). The bacterium's major insecticidal factor is the Binary (Bin) toxin, composed by the BinB and BinA subunits, which is produced as a protoxin inside crystals during the bacterial sporulation (Baumann et al., 1988). *L. sphaericus* mode of action is based on the ingestion of crystals by the culicid larvae, and subsequent midgut processing of the BinA and B protoxins into active toxins which act in synergy in order to perform their larvicidal activity (Baumann et al., 1985; Broadwell and Baumann, 1987; Charles et al., 1997; Nicolas et al., 1993). Once activated, the BinB subunit specifically binds to receptors located on the surface of the midgut microvilli of larvae, while BinA is responsible for the toxicity to these cells (Charles et al., 1997; Nicolas et al., 1993). The Bin activity against *Culex pipiens* larvae is correlated with the high affinity binding of the BinB subunit to specific glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored α -glucosidases, named Cpm1 and Cqm1 from *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus*, respectively (Darboux et al., 2001; Nielsen-Leroux and Charles, 1992; Romão et al., 2006; Silva-Filha et al., 1999). The availability of these receptors is essential for Bin toxicity and mutations found within the *cqm1* gene which disrupt the integrity and/or location of the Cqm1 receptor in the midgut are behind the major resistance events reported to date (Chalegre et al., 2012; Darboux et al., 2007; Darboux et al., 2002; Guo et al., 2013; Romão et al., 2006).

Currently, the molecular basis of the Bin-Cqm1 interaction is only partially known. In most studied cases the resistance alleles from the *cqm1* gene harbor mutations which prevent the expression of the full-length, GPI-anchored Cqm1-receptor. Mapping of these mutations did not reveal specific regions within the receptor which are responsible for its recognition by the BinB subunit. In contrast, motifs within BinB responsible for the binding interaction were mapped to the N-terminus (N33 to L158) of this 448-aminoacid long protein and specific residues $_{85}\text{IRF}_{87}$, $_{147}\text{FQF}_{149}$ (Romão et al., 2011) and Y150 (Singkhamanan et al., 2010) were found to be essential for the binding. Identifying the binding regions within Cqm1 is nevertheless critical for understanding the selectivity of the Bin toxin towards culicid larvae. Indeed, it has been observed that species with high, moderate or low *in vivo* susceptibility to *L. sphaericus*, for instance, can express highly similar α -glucosidases orthologs. In *C. pipiens* and *C. quinquefasciatus*, the most susceptible species, the Cqm1/Cpm1 proteins share 97% identity and both bind with high affinity to the Bin toxin (Nielsen-Leroux and Charles, 1992;

Silva-Filha et al., 2004; Silva-Filha et al., 2008). *Anopheles gambiae* larvae are moderately susceptible, and the Cqm1/Cpm1 ortholog (Agm3) displays 67% identity and 78% similarity to Cqm1, and it was also characterized as a Bin receptor in this species. The toxin binds to the midgut of *An. gambiae*, but its affinity is lower than that seen for *C. pipiens* (Opota et al., 2008; Silva-Filha et al., 1997). *Aedes aegypti* is taxonomically closer to *C. pipiens* than *An. gambiae*, but is refractory to *L. sphaericus*. The lethal concentration of Bin toxin to this species is between 100 and 1000-fold higher than that seen for *C. pipiens*, and the Bin toxin is unable to display significant specific binding to midgut microvilli proteins (Ferreira et al., 2010; Nielsen-Leroux and Charles, 1992). Nevertheless, a Cqm1/Cpm1 ortholog, named Aam1, was found in *Ae. aegypti* larvae which displays 74% identity and 83% similarity to Cqm1 (Ferreira et al., 2010).

The refractoriness of *Ae. aegypti* to *L. sphaericus* was first investigated by Nielsen-LeRoux & Charles (1992) which ruled out the crystal processing as the reason behind the lack of susceptibility to this bacterium. Aam1 was also found to be abundantly expressed as a GPI-anchored protein in the insect's larval stage, but was unable to bind to Bin toxin, suggesting that differences between the Cqm1/Cpm1 and Aam1 α -glucosidases could be important in determining the species' susceptibility to the Bin toxin (Ferreira et al., 2010). The current work carried out a comparative analysis of Cqm1 and Aam1 with the purpose of characterizing the molecular basis for the different binding affinities of the Bin toxin to these two proteins. This approach led to the identification of critical residues responsible for the binding of the Bin toxin to Cqm1 which are absent from Aam1. The results generated provide a framework which contributes to the understanding of the molecular basis of the Bin action on culicid larvae.

2. Materials and methods

2.1. Mosquito colonies

Culex quinquefasciatus (CqSF) and *Aedes aegypti* (RecL) colonies used in this study were maintained in the insectarium of the Department of Entomology/Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ (CPqAM-FIOCRUZ) at $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 70% relative humidity and photoperiod of 12:12 h light/darkness. Larvae were kept in tap water and fed with cat biscuits. Adults were maintained on 10% sucrose solution and the females were also fed with chicken blood.

2.2. Plasmid constructs for heterologous expression in Sf9 cells

This investigation was performed based on recombinant proteins produced in the Sf9 insect cell line. The coding sequences for the Cqm1 and Aam1 α -glucosidases were amplified by PCR from cDNA, according to the procedure previously described (Ferreira et al., 2010), using specific primers for *cqm1* (forward: 5'-CAGGGTACCTCTCCGGCCACCATGCGA-3' and reverse: 5'-CAGTCTAGAGCAGCTGCCGACGAAACCGT-3') and *aam1* (forward: 5'-CAGGGTACCAGTTCGGCTGCCGCCATGCCG-3' and reverse: 5'-CAGTCTAGAGCAGCTGCCGATGAAGCTCT-3'). These primers contain restriction sites for the *Kpn* I and *Xba* I enzymes (underlined) that were used for cloning into pIZT/V5-HisTM vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The forward 5' primers annealed to regions surrounding the proteins' start codon, so as to generate wild-type N-terminal ends, but the reverse 3' primers were designed to anneal up to positions 561 and 563 in Cqm1 and Aam1, respectively, so as to remove from the cloned fragments the region encoding the GPI-anchor signaling sequence. Chimeric constructs of *cqm1* and *aam1* were generated through the use of reciprocal restriction sites within the two genes which allowed the exchange of equivalent DNA fragments between the corresponding expression constructs. Naturally occurring restriction sites were identified in the *cqm1* gene in suitable positions and equivalent site were introduced in the *aam1* gene with the QuickChangeTM II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Alternatively, equivalent restriction sites were introduced into both genes. Restriction sites for *Xho* I and *Sac* I were then inserted into *aam1*, while a *Xba* I site was introduced in both *cqm1* and *aam1* sequences. Nearly all the mutagenesis events led to silent mutations, with the exception of the ones required for the creation of the *Xba* I sites, which led to single residue substitutions of V443L and V447L in Cqm1 and Aam1, respectively. Although both replaced an aliphatic residue with another equivalent residue. The newly created sites then allowed cutting both cloned genes as follows: *Xho* I (*cqm1* 384, Cqm1 H128; *aam1* 381, Aam1 H127), *Sac* I (*cqm1* 936, Cqm1 A312; *aam1* 948, Aam1 A316) and *Xba* I (*cqm1* 1326, Cqm1 N442; *aam1* 1338, Aam1 N446). The equivalent inserts from one gene were recovered and inserted in the plasmid containing fragments from the second gene. Site-directed mutagenesis was also used to insert mutations in selected nucleotides in *cqm1* based on the existing differences in *aam1* sequence. All recombinant proteins were expressed as soluble proteins containing a six histidine tag at their C-termini, encoded by the pIZT/V5-HisTM vector.

2.3. Transfection and protein expression

The plasmid constructs described above were introduced in Sf9 cells according to instructions from InsectSelect™ Glow System Kit (Invitrogen) by a lipid mediated transfection using the cellfectin™ II reagent. Cells were maintained in Sf-900 II SFM™ medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) until confluence, and each transfection was performed using 5 µg of plasmid and 4% Cellfectin™ (Invitrogen) in 25-cm² plates. Forty-eight hours after this procedure, cell cultures were selected with Zeocin™ (150-300 µg/mL) (Invitrogen) to obtain the recombinant cell lines. Cell culture media containing soluble proteins was collected and analyzed, as described in the following sections.

2.4 Preparation of Cqm1 and Aam1 protein samples

Cqm1 and Aam1 native proteins from brush border membrane fractions (BBMF) of *C. quinquefasciatus* and *Ae. aegypti* larvae, respectively were obtained as previously described (Silva-Filha *et al.*, 1997). Enrichment of the α -glucosidase activity (EC 3.2.1.20) was used as a marker for proteins from the apical cell membranes and the activity in the samples was evaluated according to Ferreira *et al.* (2010). The respective soluble recombinant proteins were obtained from the cell culture media samples and were used in pull-down assays. Alternatively, recombinant proteins from the media were purified using Ni-NTA resin (Qiagen, Hilden, Germany) or were precipitated with trichloroacetic acid at 10%. Protein content was determined by the Bio-Rad protein assay® (Biorad, Hercules, CA, USA) (Bradford, 1976) or based on a comparative gel assay using a standard curve of bovine serum albumin. Samples were stored at -70° C until use.

2.5 SDS-PAGE and immunoblotting

Protein samples were separated on 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose Amershan™ Hybond™-ECL membranes (GE Health Sciences, Freiburg, Germany). Immunodetection was performed using SNAP id™ Protein Detection system (Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were blocked in 50 mM Tris-HCl/150 mM NaCl/0.1% Tween 20 pH 7.6, containing 0.1% nonfat dry milk. The detection of Cqm1/Aam1 proteins was carried out through incubation with anti-Cqm1 antibodies, affinity purified from a rabbit polyclonal serum at a 1:1000 dilution, followed by incubation with the secondary serum, goat anti-rabbit IgG antibodies conjugated to horseradish peroxidase at a 1:5000 dilution. The blots were developed using the Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore). Molecular

weights of the proteins were estimated using the software L-PIX IMAGE EX 1.0.0 (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brazil).

2.6 α -glucosidase assays

Protein samples were subjected to an α -glucosidase activity (E.C. 3.2.1.20) assay by incubating with 2 mM p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (Sigma, St Louis, MO, USA) in 0.1 M sodium citrate-phosphate buffer pH 6.5 at 37°C. Samples were kept under the same incubation conditions without the test protein, were used as negative controls. Detection of the α -glucosidase activity was also performed using purified samples of recombinant Cqm1 (10 μ g), previously incubated with Bin toxin (1 μ M) for 2h at room temperature in a final volume of 100 μ l of PBS (2.1 mM NaH₂PO₄, 14 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7.4). Samples incubated under the same conditions without Bin toxin, were used as controls.

2.7 Deglycosylation assays

Post-translational modifications predicted in the Cqm1 and Aam1 sequences, in this case glycosylation, were analyzed using NetNGlyc 1.0 and NetOGlyc 3.0 to identify potential putative N- and O-glycosylation sites, respectively. The presence of carbohydrates in the proteins was analyzed through treatment with the endoglycosidase PNGase F (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), which is able to remove a range of oligosaccharides from N-linked glycoproteins. Samples of BBMF or Cqm1/Aam1 recombinant proteins (10-20 μ g) were incubated with PNGase F at 37°C for 1 h, in duplicate, according to manufacturer's instructions. Samples incubated under the same conditions, without the enzyme, were used as untreated controls. All samples were subjected to SDS-PAGE, immunoblotting and pull-down assays, as described in sections 2.5 and 2.8, in order to evaluate protein deglycosylation and the capacity of the Cqm1/Aam1 proteins to bind BinB after this treatment.

2.8 Pull-down assays

These binding assays were performed as previously described (Romão et al., 2006) using recombinant BinB expressed in *Escherichia coli* fused to glutathione S-transferase (BinB-GST). Briefly, cell culture media samples enriched with Cqm1 or Aam1 recombinant proteins (20 μ g) were incubated with the recombinant BinB toxin (5 μ g) immobilized on glutathione-sepharose 4B™ (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) beads (20 μ l) (Bin-beads), for 2 h at 4°C in BB3 buffer (100 mM KCl /1 mM MgCl₂/50 mM HEPES/0.2% Nonidet P-

40%/5% glycerol), under agitation. Protein samples incubated with glutathione-S-transferase immobilized on glutathione-sepharose beads (GST-beads) were used as negative control. After the incubation, BinB- or GST-beads were collected by centrifugation (1.500 g, 2 min at 4°C) and washed three times with BB3 buffer. Samples were solubilized in Laemmli sample buffer, boiled for 5 min, separated on 10% SDS-PAGE and evaluated through immunoblotting as described in section 2.5.

2.9 Protein modeling

The Cqm1 proteins here studied were structurally modeled by the I-TASSER (“Iterative Threading Assembly Refinement”) tool, which can be defined as an integrated platform for automatized prediction of function and protein structure (Roy et al., 2010). The top template used by this modeling tool was a MalL enzyme from *Bacillus subtilis* (PDB number: 4M8U; resolution: 1.45 Å), which has 51% of similarity to the Cqm1 α -glucosidases analyzed by I-TASSER in this study. I-TASSER calculates a confidence score for the model and values bigger than -1.5 can be considered an reliable model with a correct fold according to the parameters of this tool (Roy et al., 2010). In addition, it calculates the RMSD (Root Mean Square Deviation) that can be understood as the measure of the average distance between the atoms of superimposed proteins, in this case the template protein and the Cqm1 proteins. RMSD can be used as model assessment measure, and models with RMSD lower than 1.5 Å are considered high-resolution models (Baker and Sali, 2001). The confidence scores for the models of the wild Cqm1 and the mutant MutPATGGG (Table 1) were -0.30 and -0.23, respectively. The RMSD for these protein compared to 4M8U was 0.65 Å and 0.63 Å, respectively. To visualize the models generated by I-TASSER, the UCSF Chimera software (Pettersen et al., 2004) was used with two different diagrams Ribbons and Atoms/Bonds. After the modeling step, the models for mutant Cqm1 proteins were compared against the wild-type Cqm1 model.

3. Results

3.1. Expression of Cqm1 and Aam1 in insect Sf9 cells

Cqm1 and Aam1 were expressed in Sf9 cells as soluble proteins secreted to the culture media, since sequences encoding the GPI anchor were removed and the last residue for Cqm1 and Aam1 sequences is the alanine located at positions 561 and 563, respectively (Fig. 1). The

two proteins retained their α -glucosidase activity, confirmed through the detection of the enzyme activity present in samples purified from the cultures' supernatant (Supplementary Fig. 1), an indication of adequate processing and folding after secretion through the cellular membranes. The recombinant Ni-NTA purified Aam1 protein displayed higher α -glucosidase activity than the respective sample of Cqm1, and the activity observed in BBMF from these species showed the same pattern (Supplementary Fig. 1). The expression of the recombinant proteins was also confirmed through immunoblotting with anti-Cqm1 antibodies, which confirmed apparent molecular weights of ≈ 65 - and ≈ 72 -kDa for Cqm1 and Aam1, respectively (Fig. 2). These sizes are compatible with those of the corresponding native proteins, derived from *C. quinquefasciatus* and *Ae. aegypti* midgut epithelium (BBMF), taking into account the differences expected due to the presence of the histidine-tag and the absence of their extreme C-terminal ends, which contain the GPI anchors.

3.2. Glycosylation and BinB binding properties of Cqm1/Aam1

Recombinant Cqm1 and Aam1 were tested to evaluate if they were subjected to glycosylation events in the Sf9 cells, since native Aam1, but not Cqm1, has been previously shown to be glycosylated (Ferreira et al., 2010). Both proteins were then treated with the endoglycosidase PNGase F prior to immunoblotting and Cqm1 displayed a molecular weight equivalent to the non treated sample, while Aam1 showed a reduction from ≈ 72 - to 65- kDa. The reduction in size detected for Aam1 confirms that it is expressed as a glycosylated protein whilst this does not seem to be the case for Cqm1, although this analysis is not conclusive for Cqm1 (Fig. 2). These results are compatible with what was seen for the native proteins from the larvae BBMF, and indicate that the differences in glycosylation events are due to changes in the amino acid sequences of the two proteins and not to differences in the glycosylation apparatus of the two insect species. Indeed, *in silico* analysis of glycosylation prediction showed potential N-glycosylation sites for both Cqm1 and Aam1 respectively (Fig. 1), while O-glycosylation sites were not detected in either sequence. Pull-down assays were then carried out to investigate whether the Sf9 expressed proteins were able to bind the Bin toxin. These assays used recombinant Bin toxin, expressed in *E. coli* as a Glutathione-S-transferase (GST) fusion protein, which has been previously shown to bind native Cqm1 only. The two ectopically expressed proteins kept the binding features of their native counterparts: Cqm1 specifically bound to BinB-GST but no binding was detected for Aam1 (Fig. 3).

As a first approach to investigate the reasons for the differences in BinB binding between the Cqm1 and Aam1, the role of glycans in the BinB binding properties of these

proteins was evaluated. Recombinant Cqm1 and Aam1 proteins were treated with PNGase and then tested for their binding capacity to GST-BinB, but showed no differences when compared to control samples which had not been subjected to this treatment (data not shown). To further rule out the possibility of glycans being involved in the interaction between Cqm1 and BinB, a highly predicted N-glycosylation site (${}_{100}\text{NLT}_{102}$) in Cqm1, not conserved in Aam1, was assessed by site-directed mutagenesis. The mutant MutNLT protein, where these residues were replaced by those from the Aam1 sequence (TLE), migrated with a size, similar to the wild-type Cqm1 and its binding capacity to the Bin toxin was not affected (Supplementary Fig. 2).

3.3 Mapping of the Cqm1 region involved in BinB binding

Taking advantage of the opposing binding properties of Cqm1 and Aam1 and to broadly map within Cqm1 segments which could be required for the interaction with the GST-Bin toxin, chimeric proteins were constructed containing different portions of Cqm1 and Aam1 sequences (Fig. 4). These chimeras were named as follows: N1 (Cqm1₁₋₁₂₈/Aam1₁₂₈₋₅₆₃), C1 (Aam1₁₋₁₂₇/Cqm1₁₂₉₋₅₆₁), C2 (Aam1₁₋₃₁₆/Cqm1₃₁₃₋₅₆₁) and C3 (Aam1₁₋₄₄₆/Cqm1₄₄₃₋₅₆₁). The junction points of the chimeras were designed and introduced in segments identical in the two proteins, so as to minimize the possibility of introduction of potentially misfolded segments. After expression in Sf9 cells, the chimeras were tested through pull-down assays to evaluate their ability to interact with BinB. A specific band corresponding to the C1 chimera was immunodetected in the incubation with GST-BinB which did not bind to the GST protein used as negative control (Fig 4). In contrast, neither N1, nor C2 or C3 chimeras showed any detectable binding to BinB. The only segment from Cqm1 which is present in C1 but is absent from the N1, C2 and C3 chimeras is the one encompassing residues S129 to A312, localized to the N-terminal half of the protein. Despite its high level of conservation between Cqm1 and Aam1, with equivalent segments sharing 74% identity and 83% similarity between the two proteins (Fig. 1), this segment then is implicated in the specific interaction observed between Cqm1 and the BinB toxin.

Since two of four conserved motifs typical of the α -amylase family, identified in the Cqm1 sequence by *in silico* analysis, are entirely located in the S129-A312 segment (Fig. 1), a potential association between catalytic and Bin binding activity within this segment was investigated. On this purpose, the α -glucosidase activity of the wild-type recombinant Cqm1 was tested after its incubation with Bin toxin and compared with the activity observed from control samples in the absence of the Bin toxin. The activity detected for the Bin-bound Cqm1

and Cqm1 control samples were similar suggesting that the Bin binding sites and the conserved domains of α -glucosidases might not be related (Supplementary Fig. 2).

3.4 Fine mapping of BinB binding motifs in Cqm1

The identification of the S129-A312 segment from Cqm1 as being implicated in mediating the specific binding to BinB facilitated the selection of specific residues within this segment in Cqm1, non-conserved in the equivalent Aam1 segment, which could be involved in this interaction. Selected residues from Cqm1 were replaced, through site-directed mutagenesis, with their Aam1 counterparts. A first set of eleven Cqm1 mutant proteins were generated, containing between one and four residues replaced by their Aam1 equivalents, and with all mapped to different positions within the selected segment (Table 1). From a total of 184 residues encompassing the S129-A312 segment, 42 were not identical between the two proteins (Fig. 1), and 26 of them were investigated here. All proteins were expressed and evaluated to test whether mutations in Cqm1 would be able to disrupt its binding ability to BinB through *in vitro* pull-down assays. Most of the mutant proteins analyzed maintained the specific binding to BinB-GST observed for the wild-type protein. The single exception was the mutant Cqm1 MutPATGGG where the motif ¹⁵⁵PATGGG₁₆₀ from Cqm1 was replaced by AETGKL, the equivalent sequence in Aam1 (residues underlined are the ones which differ between the two proteins) (Fig. 5). These residues correspond to a small but poorly conserved spot between Cqm1 and Aam1 and this mutation introduced into Cqm1 led to the loss of its ability to bind BinB. To better delimit the Cqm1 residues involved in the interaction with BinB, two other Cqm1 mutants were generated where either the ¹⁵⁵PA₁₅₆ or ¹⁵⁹GG₁₆₀ doublets were replaced by their Aam1 equivalents (AE or KL, respectively). The resulting binding assays showed that Cqm1 containing the ¹⁵⁵PA₁₅₆ mutation maintained its ability to bind to GST-BinB, whereas the ¹⁵⁹GG₁₆₀ mutant did not show detectable binding to BinB, delimiting these as key residues involved in the Cqm1/BinB interaction (Fig. 5). It should be noted that, apart from the indicated substitutions, the Aam1 sequence also shows insertions immediately before (₁₄₅YVWHP₁₄₉) and after (₁₅₆D) the AETGKL motif, which are missing from Cqm1. It is likely that in the wild-type Aam1, these insertions should also interfere with the capacity to bind to the BinB toxin.

3.5 Evaluating further Cqm1 motifs potentially involved in the binding to BinB

The approach used here to identify residues within the S129-A312 segment from Cqm1 implicated in the binding to the BinB toxin does not rule out that other motifs localized outside this segment might also be involved in this interaction. Indeed another segment identified from Cpm1, which could be involved in the interaction with BinB, is the one missing from the Cpm1_{BP-del} protein, a mutant previously implicated in the resistance of *C. pipiens* to Bin toxin. This mutant is lacking 66 amino acids, between V393 and Q458, was unable to bind to Bin toxin, despite its correct location on the insect's midgut epithelium by a GPI-anchor (Darboux et al., 2007). Here, by comparing the V393-Q458 segment from Cqm1 with its Aam1 counterpart, eight further mutations were designed in order to evaluate the role which any of those non conserved residues between Cqm1 and Aam1 might have in the interaction with BinB. The new Cqm1 mutants (Table 1) were expressed in Sf9 cells and subjected to pull-down assays and all proteins retained the ability to bind BinB, indicating that the residues targeted are not substantially involved in the interaction with BinB. Supplementary Fig. 2 shows the binding of two Cqm1 mutants to BinB, representing all those tested. It seems plausible then that this segment does not contain binding sites for BinB, but its deletion, within the context of the Cpm1_{BP-del} protein, would prevent the correct folding of the protein, as indicated by the modeling data described in the next section. Seven mutants in residues from other Cqm1 regions were also evaluated (Table 1), however, these mutant proteins retained their capacity of binding to BinB (data not shown). Overall, 28 mutant proteins replacing 58 non identical residues between the Cqm1 and Aam1 sequences were investigated and only two, ¹⁵⁹GG₁₆₀ doublet, were implicated in the interaction between BinB and Cqm1.

3.6 Wild-type and mutant Cqm1 modeling

In order to support the results derived from the mutagenesis experiments, and to better understand the functional implications of the residues identified as relevant for the interaction with BinB, modeling of the wild-type Cqm1 and the Cqm1 MutPATGGG mutant was carried out. The predicted model for the wild-type Cqm1 protein is composed of twelve α -helices and the same number of β -sheets (Fig. 6). Within this model the motif ¹⁵⁵PATGGG¹⁶⁰ localizes to an exposed loop positioned between the 4th and 5th α -helices (Fig. 6) and compatible with a toxin binding site. When an equivalent model was generated using the mutant sequence, where this motif was replaced by AETGKL from the Aam1 sequence, changes in conformation were observed within this loop, where the modifications in the lateral side-

chains of the residues are seen (Fig. 6). An atoms/bonds diagram representation of these same structures, in two different views distinguished by a 90° counter-clockwise turn (Supplementary Fig. 3), highlights the S129-A312 segment, the mutated residues and also the V393-Q458 segment corresponding to the 66 deleted residues from the Cqm1_{BP_del} mutant described by Darboux et al. (2007). This representation shows the modifications observed in the loop containing the residues which are critical for the Cqm1 binding to the Bin toxin, and highlights its distance to the V393-Q458 segment.

4. Discussion

Previous attempts to perform this investigation, using recombinant Cqm1 and Aam1 expressed in *E. coli* or using the eukaryotic system based on the rabbit reticulocyte lysate, led to proteins which apparently were not correctly processed and were not adequate for the experiments proposed (data not shown). Using the Sf9 cells, however, both recombinant proteins displayed properties similar to those seen for the native proteins, in terms of molecular weight, α -glucosidase activity and capacity to bind the Bin toxin. The specific glycosylation seen only for Aam1, equivalent to that observed for the native protein (Ferreira et al., 2010), highlights the different properties observed between these orthologs, and which are solely derived from their amino acid sequences, taking in account the fact that both are produced in the same expression system in parallel experiments. Our data confirm previous studies that have successfully produced and evaluated the functionality of these proteins using the Sf9 cells expression system (Darboux et al., 2007; Darboux et al., 2002; Opota et al., 2008). The lack of cell machinery to insert post-translational modifications and to promote the proper folding are probable reasons for the failure found in alternative expression systems (Altmann et al., 1999). The BinB binding capacity displayed by the recombinant Cqm1 produced in Sf9 cells also ruled out the need for any accessory proteins which could be required for this binding to occur within the *Culex* midgut.

The comparative analysis of Cqm1 and Aam1 revealed that N-glycosylation, one of the main post-translational modifications that influences protein conformation and confers thermal stability (Shental-Bechor and Levy, 2008), is a remarkable difference existing between these proteins (Ferreira et al., 2010). The possibility that glycans inserted in Aam1 protein could hide or prevent the access of the Bin toxin to a conserved binding site was previously considered, but the removal of carbohydrates from this protein by endoglycosidase treatment did not change its non-binding status, as it was shown using native proteins (Ferreira et al., 2010) and the function of this major post-translational modification targeting

Aam1 remain to be defined. N- and O-glycans found in aminopeptidases (APNs) from lepidopteran were previously identified as the binding sites for the Cry1A toxins (Burton et al., 1999; Gill et al., 1995; Jenkins et al., 2000; Jurat-Fuentes and Adang, 2004; Knight et al., 2004). The identification of putative N-glycosylation sites within the Cqm1 sequence, which were absent from Aam1, raised the possibility that glycans could have a role within the BinB/Cqm1 interaction, despite the lack of evidence for glycosylation of Cqm1. This possibility was also ruled out by both the treatment of Cqm1 with the glycosidase PNGaseF and the site-directed mutagenesis targeting the most likely N-glycosylation site found only in Cqm1 (₁₀₂NLT₁₀₄), since neither interfered in its capacity to bind to the Bin toxin. This is in agreement with the study of Nielsen-LeRoux and Charles (1992) that showed the lack of influence of sugars in the Bin toxin binding to the BBMF from *C. pipiens*. The binding of the mosquitocidal Cry11Aa toxin to the APNs of *Ae. aegypti* larvae is also glycan-independent (Chen et al., 2009).

Preliminary evidence provided by us and others have suggested that the BinB binding motif was localized within the N-terminal region of Cqm1 (Guo et al., 2013; Romão et al., 2006). These conclusions were, however, based on recombinant proteins from *E. coli*, which on a second assessment, displayed limitations in protein folding and in reproducibility of the binding assays (Ferreira et al., 2010). Still, the use here of the system based on the Sf9 cells for protein expression confirmed the localization of this motif to within the protein's N-terminal half, and the requirement for the segment between S129 and A312 for the binding to occur. This segment displays several amino acid differences when the Cqm1 and Aam1 proteins are compared, despite the overall high level of conservation observed. Nevertheless, the extensive site-directed mutagenesis carried out in Cqm1 targeting the divergent positions implicated only the ₁₅₉GG₁₆₀ doublet in the interaction with BinB. It is possible that the replacement of two small aliphatic non-charged residues (GG) by a charged residue (K) and an aliphatic residue with a distinct hydrophobic profile (L), both with long side-chains, might create a physical blockage which prevented the binding by BinB, even if those two residues are not directly involved in the interaction. Their localization within an exposed loop is consistent with this being an important region for toxin binding, especially considering that loops and α -helices have been reported as regions commonly involved in toxin-receptor interactions, as recently reviewed (Bravo et al., 2013). Although only this one critical mutation interfered with the BinB binding, it is worth to notice that these amino acids are located on a larger spot comprising other divergent residues, including the insertion of five amino acids, which might further render Aam1 inaccessible to BinB. It is also possible that

other residues, outside this region and not investigated in this study, could be involved in the binding.

This study confirms that the Cqm1 and Aam1 orthologs, from two closely related mosquito species, display dramatically different capacities to bind the Bin toxin likely associated to the non-conserved loop described in the text. A recent study demonstrated that aminopeptidase isoforms from the lepidopteran *Ostrinia nubilalis* have different binding capacities to the Cry1Ab and Cry1Fa toxins (Crava et al., 2013), while APNs isoforms from the different species, *Bombyx mori* and *Plutella xylostella*, seem to share a common binding region for the Cry1A toxins (Nakanishi et al., 2002), showing the differential roles assumed by these molecules. In the case of *Ae. aegypti* refractoriness to the Bin toxin, a previous study has ruled out some factors that could be implicated in this feature including the lack of *aam1* gene transcription, low expression of Aam1 in the midgut and lack of GPI-anchor (Ferreira et al., 2010). Instead, the present study suggests that at least the presence of the ¹⁵⁸GG₁₆₀ doublet of Cqm1, which is not conserved in Aam1, is required for binding the Bin toxin and could explain the lack of activity of the Bin toxin towards *Ae. aegypti*. To date, it is still not clear if these critical residues from the Cqm1 protein are needed for the loop structure, making other residues that could directly participate in binding more accessible, or if they are binding sites themselves, which we consider unlikely. Further studies based in the evaluation of an Aam1 protein modified in those residues will be important to better understand their role for the binding activity. It should also be taken in account that the evaluation of Cqm1 binding in this study was based on qualitative assays and subtle effects such as small reduction of binding could occur without being detected by this method. It is important to mention that aside from the identified binding region, other residues might be needed for the interaction between these proteins. Further studies are necessary to improve our understanding of these interactions.

Acknowledgments

We thank the insectarium team from the Department of Entomology (CPqAM-FIOCRUZ) for the technical support; Dr. Laura Gil for advising the work using Sf9 cells; Dr. Roberto Dias Lins Neto (Department of Chemistry, UFPE) and M.Sc Isabelle Freire Tabosa Viana (Instituto Carlos Chagas-FIOCRUZ) for fruitful suggestions to the study; the Program for Technological Development in Tools for Health PDTIS-FIOCRUZ for using its facilities. This study was supported by the Brazilian agencies Fundação de Amparo à Ciência e

Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE grant APQ 0427-2.13/08, fellowship IBPG-0581-4.06/09) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq Brazil, grant 472491/2012-1).

References

- Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I.B., Marz, L., 1999. Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconj. J.* 16, 109-123.
- Baker, D., Sali, A., 2001. Protein structure prediction and structural genomics. *Science* 294, 93-96.
- Baumann, L., Broadwell, A.H., Baumann, P., 1988. Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4- and 41.9-kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. *J. Bacteriol.* 170, 2045-2050.
- Baumann, P., Unterman, B.M., Baumann, L., Broadwell, A.H., Abbene, S.J., Bowditch, R.D., 1985. Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. *J. Bacteriol.* 163, 738-747.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bravo, A., Gomez, I., Porta, H., Garcia-Gomez, B.I., Rodriguez-Almazan, C., Pardo, L., Soberon, M., 2013. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microb. Biotechnol.* 6, 17-26.
- Broadwell, A.H., Baumann, P., 1987. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1333-1337.
- 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.
- Chalegre, K.D., Romão, T.P., Tavares, D.A., Santos, E.M., Ferreira, L.M., Oliveira, C.M.F., de-Melo-Neto, O.P., Silva-Filha, M.H.N.L., 2012. Novel mutations associated to *Bacillus sphaericus* resistance are identified in a polymorphic region of the *Culex quinquefasciatus* *cqml* gene *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6321-6326.
- Charles, J.F., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Humphreys, M.J., Berry, C., 1997. Binding of the 51- and 42-kDa individual components from the *Bacillus sphaericus* crystal toxin to mosquito larval midgut membranes from *Culex* and *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae). *FEMS Microbiol. Lett.* 156, 153-159.

- Chen, J., Aimanova, K.G., Pan, S., Gill, S.S., 2009. Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 688-696.
- Crava, C.M., Bel, Y., Jakubowska, A.K., Ferre, J., Escriche, B., 2013. Midgut aminopeptidase N isoforms from *Ostrinia nubilalis*: activity characterization and differential binding to Cry1Ab and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 924-935.
- Darboux, I., Charles, J.F., Pauchet, Y., Warot, S., Pauron, D., 2007. Transposon-mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Cell Microbiol.* 9, 2022-2029.
- Darboux, I., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., Pauron, D., 2001. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 981-990.
- Darboux, I., Pauchet, Y., Castella, C., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., Pauron, D., 2002. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 5830-5835.
- Ferreira, L.M., Romão, T.P., de-Melo-Neto, O.P., Silva-Filha, M.H., 2010. The orthologue to the Cpm1/Cqm1 receptor in *Aedes aegypti* is expressed as a midgut GPI-anchored alpha-glucosidase, which does not bind to the insecticidal binary toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 604-610.
- 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.
- Guo, Q.Y., Cai, Q.X., Yan, J.P., Hu, X.M., Zheng, D.S., Yuan, Z.M., 2013. Single nucleotide deletion of cqm1 gene results in the development of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus*. *J. Insect Physiol.* 59, 967-973.
- Jenkins, J.L., Lee, M.K., Valaitis, A.P., Curtiss, A., Dean, D.H., 2000. Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 14423-14431.
- Jurat-Fuentes, J.L., Adang, M.J., 2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *European journal of biochemistry / FEBS* 271, 3127-3135.

- 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.
- Lacey, L.A., 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23, 133-163.
- 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.
- Nicolas, L., Nielsen-Leroux, C., Charles, J.F., Delécluse, A., 1993. Respective role of the 42- and 51-kDa components of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 106, 275-280.
- Nielsen-Leroux, C., Charles, J.F., 1992. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. *European journal of biochemistry / FEBS* 210, 585-590.
- Opota, O., Charles, J.F., Warot, S., Pauron, D., Darboux, I., 2008. Identification and characterization of the receptor for the *Bacillus sphaericus* binary toxin in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Comp. Biochem. Physiol. -Part B Biochem. Mol. Biol.* 149, 419-427.
- 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.
- Romão, T.P., de-Melo-Neto, O.P., Silva-Filha, M.H., 2011. The N-terminal third of the BinB subunit from the *Bacillus sphaericus* binary toxin is sufficient for its interaction with midgut receptors in *Culex quinquefasciatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 321, 167-174.
- Romão, T.P., de Melo Chalegre, K.D., Key, S., Ayres, C.F., Fontes de Oliveira, C.M., de-Melo-Neto, O.P., Silva-Filha, M.H., 2006. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its alpha-glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. *FEBS J.* 273, 1556-1568.
- Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y., 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* 5, 725-738.
- Shental-Bechor, D., Levy, Y., 2008. Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105, 8256-8261.

Silva-Filha, M.H., Nielsen-Leroux, C., Charles, J.F., 1997. Binding kinetics of *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush-border membranes of *Anopheles* and *Culex* sp. mosquito larvae. European journal of biochemistry / FEBS 247, 754-761.

Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 1999. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Insect Biochem. Mol. Biol. 29, 711-721.

Silva-Filha, M.H., Oliveira, C.M., Regis, L., Yuan, Z., Rico, C.M., Nielsen-LeRoux, C., 2004. Two *Bacillus sphaericus* binary toxins share the midgut receptor binding site: implications for resistance of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) larvae. FEMS Microbiol. Lett. 241, 185-191.

Silva-Filha, M.H.N.L., Chalegre, K.D., Anastacio, D.B., Oliveira, C.M.F., Silva, S.B., Acioli, R.V., Hibi, S., Oliveira, D.C., Parodi, E.S.M., Marques Filho, C.A.M., Furtado, A.F., Regis, L., 2008. *Culex quinquefasciatus* field populations subjected to treatment with *Bacillus sphaericus* did not display high resistance levels. Biological Control 44, 227-234.

Singkhamanan, K., Promdonkoy, B., Chaisri, U., Boonserm, P., 2010. Identification of amino acids required for receptor binding and toxicity of the *Bacillus sphaericus* binary toxin. FEMS Microbiol. Lett. 303, 84-91.

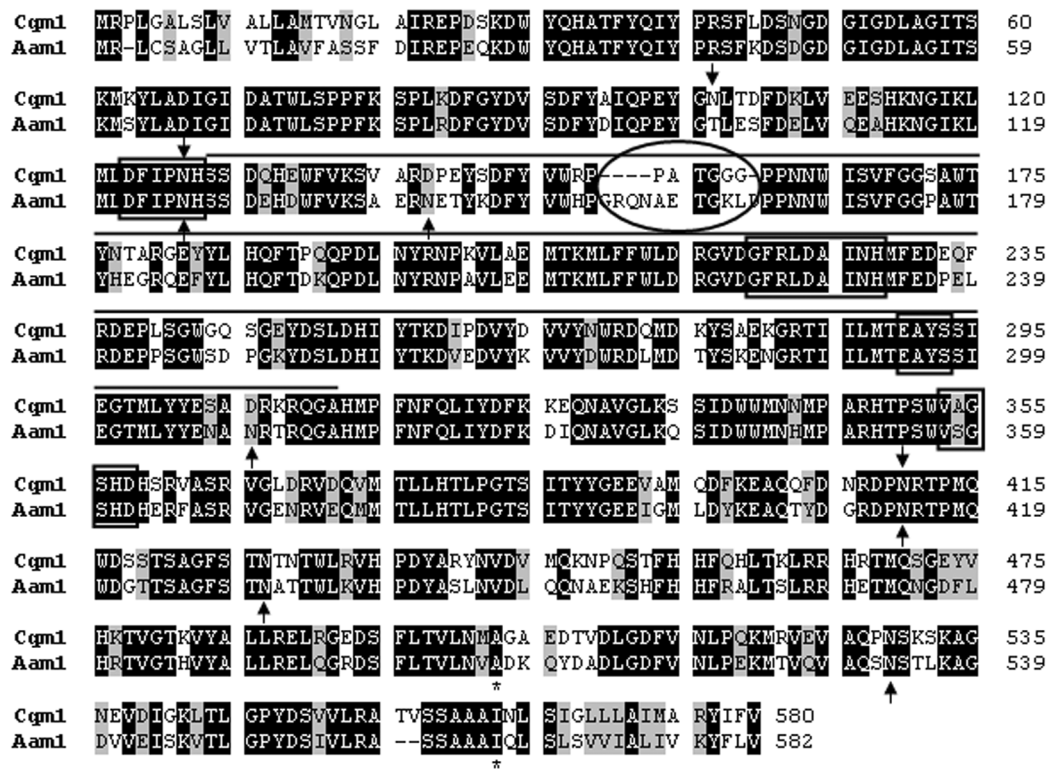


Fig. 1. Amino acid sequence alignment of the Cqm1 and Aam1 α -glucosidases from *Culex quinquefasciatus* (GenBank accession: [ABC59609.1](#)) and *Aedes aegypti* (GenBank accession: [XP_001660909.1](#)) performed with Clustal W. Amino acids that are identical and those defined as similar, are shown in black and grey, respectively. Spaces were inserted within the various sequences (dashes) to allow better alignment, when necessary. Predicted glycosylation sites (arrows), conserved α -glucosidases motifs (squares), the putative BinB binding segment 129S-A312 (underlined) and the loop containing residues identified in the present work involved in BinB binding (circle) are all indicated. The asterisk is shown just after the last residue (A) kept in the Cqm1 and Aam1 recombinant proteins, since the sequences encoding the GPI anchor were removed during the cloning procedures for the purpose of producing soluble polypeptides in SF9 cells.

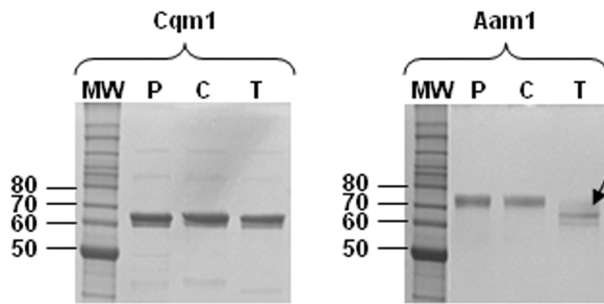


Fig. 2. Endoglycosidase treatment of Cqm1 and Aam1 recombinant proteins. Samples were incubated with PNGase F at 37 °C and separated on 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and subjected to immunodetection with an anti-Cqm1 antibody which recognizes both proteins with the same efficiency. P. Protein load, without incubation. C. Negative control, incubated at 37 °C without PNGase F. T. Sample treated with PNGase F, as described. The arrow highlights the decrease in molecular weight observed for Aam1 after PNGase F treatment. MW. Molecular weight markers (kDa).

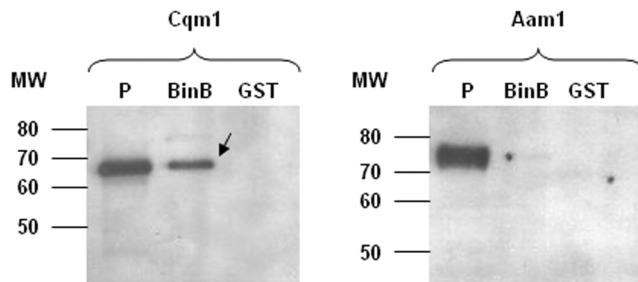


Fig. 3. Pull-down assay to evaluate the binding of the Cqm1 and Aam1 recombinant proteins to BinB-GST. Samples were incubated with BinB-GST or GST only (negative control) immobilized on Glutathione-sepharose beads. Bound proteins were separated on 10% SDS-PAGE, prior to blotting and immunodetection with the anti-Cqm1 antibody. P. Protein load equivalent to the amount incubated with the BinB-GST or GST only samples. The arrow shows the immunodetection of Cqm1 bound to BinB-GST. MW. Molecular weight markers (kDa).

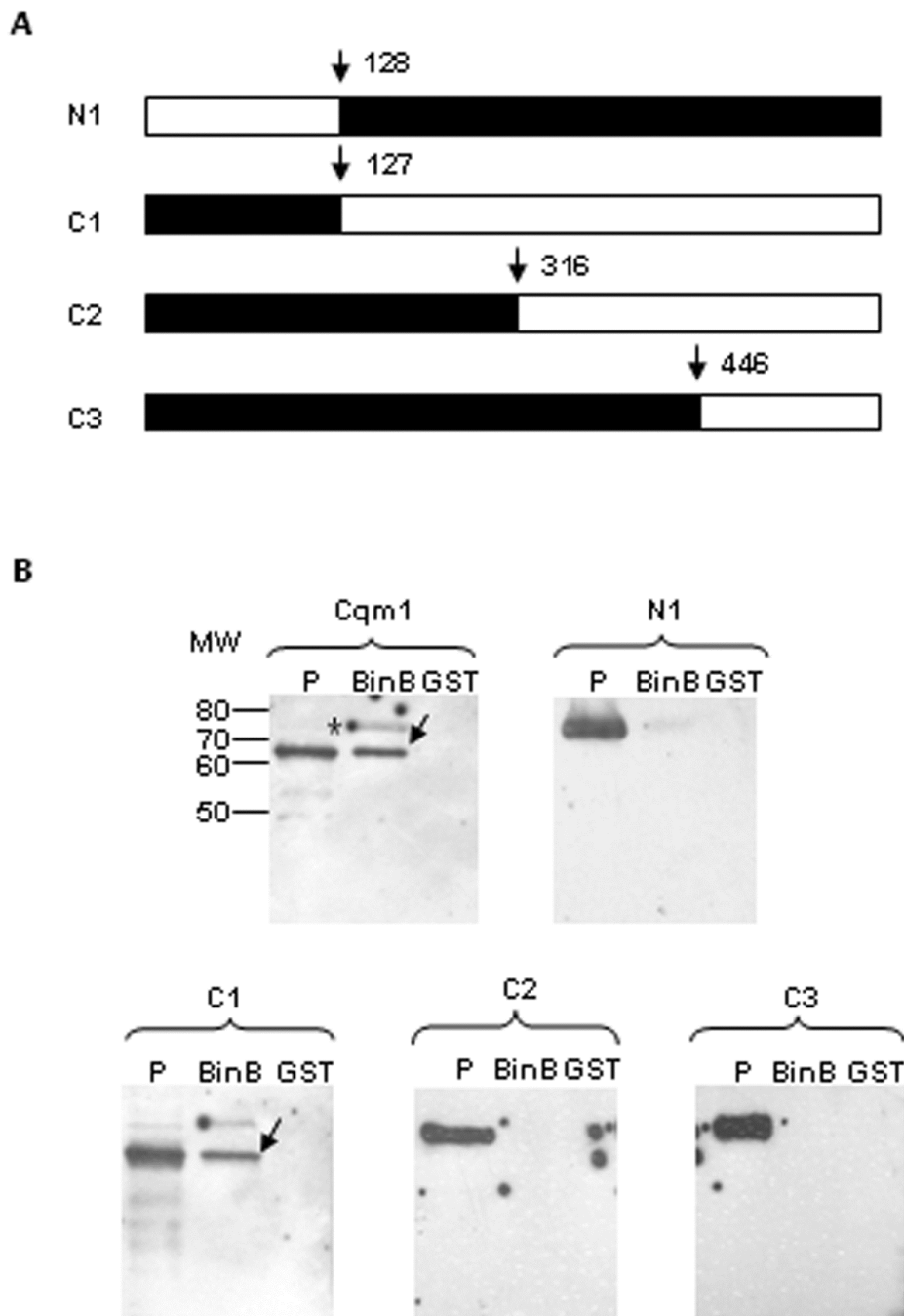


Fig. 4. Pull-down assay to evaluate the binding of recombinant chimeras of Cqm1 and Aam1 with BinB-GST. (A) Chimeras were formed consisting of specific regions of the Cqm1 (white) and Aam1 (black) native proteins and they were named N1, C1, C2 and C3. The amino acid positions where the regions of each protein were joined are indicated by arrows which highlight the last amino acid from each N-terminal segment. (B) The Sf9 expressed wild-type Cqm1 and the different chimeras were incubated with recombinant BinB-GST or GST only (negative control) immobilized on Glutathione-sepharose beads. Bound proteins were submitted to immunodetection with the anti-Cqm1 antibody, as described before. The asterisk indicates the BinB-GST band which cross-react with the polyclonal serum used for the immunoblotting procedure that is observed in some BinB lanes. MW. Molecular weight markers (kDa).

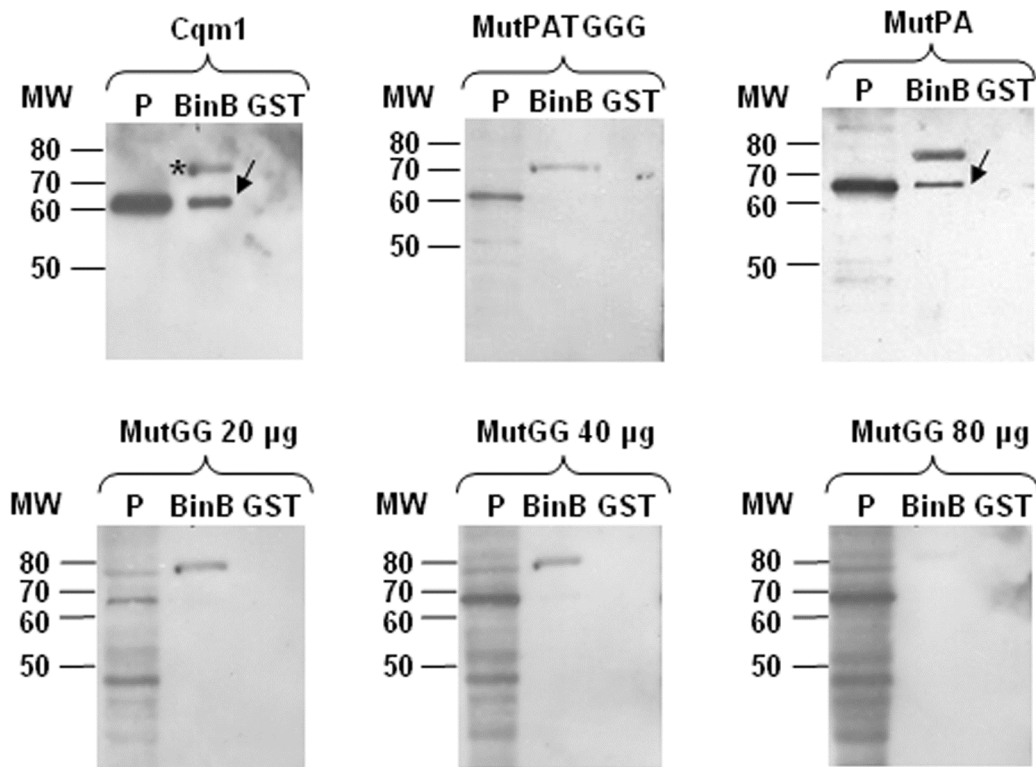


Fig. 5. Analysis of the interaction between different mutant Cqm1 proteins and BinB-GST, evaluated through pull-down assay and immunoblotting. Mutant proteins in selected amino acids (MutPATGGG, MutGG, MutPA) were incubated with BinB-GST or GST only (negative control) immobilized on Glutathione-sepharose beads. Bound proteins were submitted to immunodetection with the anti-Cqm1 antibody as described before. The arrows show the immunodetection of Cqm1 and Cqm1 MutPA protein bound to BinB. The asterisk indicates the BinB-GST band which cross-react with the polyclonal serum used for the immunoblotting procedure that is observed in some BinB lanes. MW. Molecular weight markers (kDa).

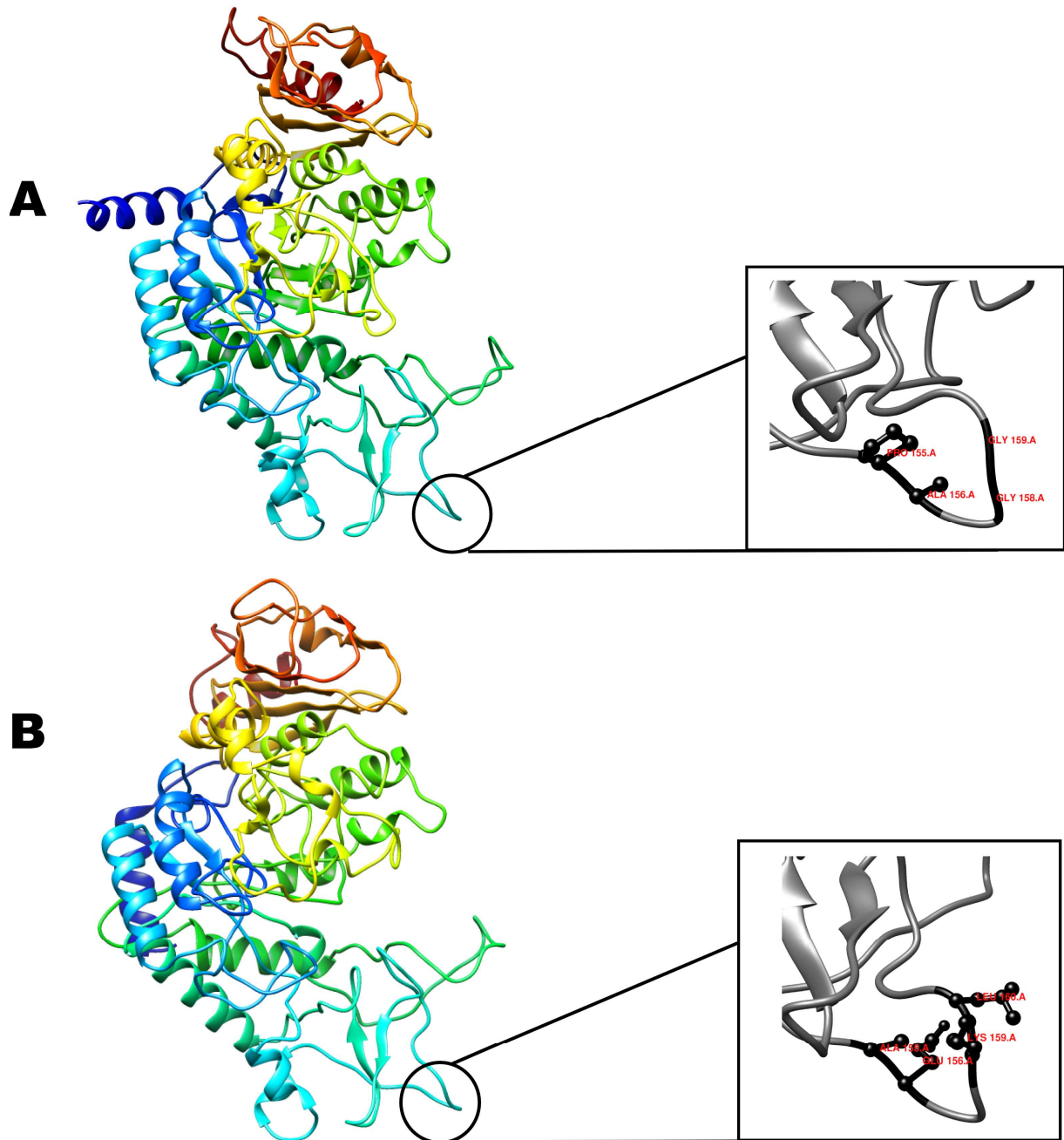
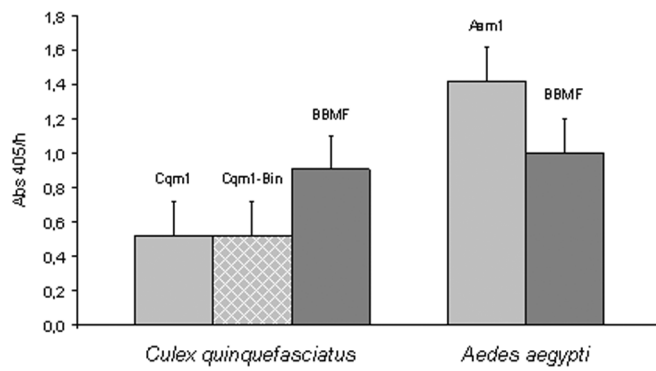
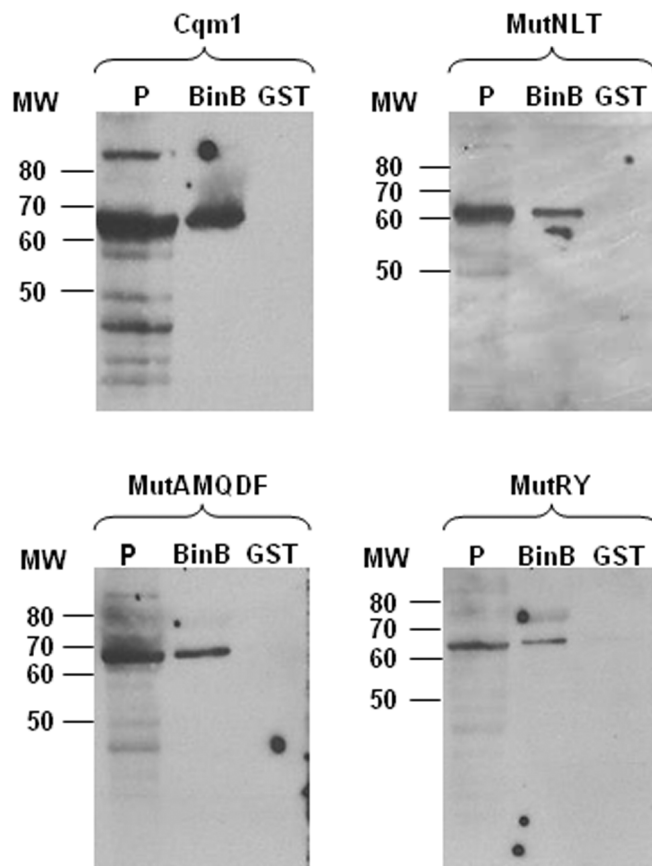


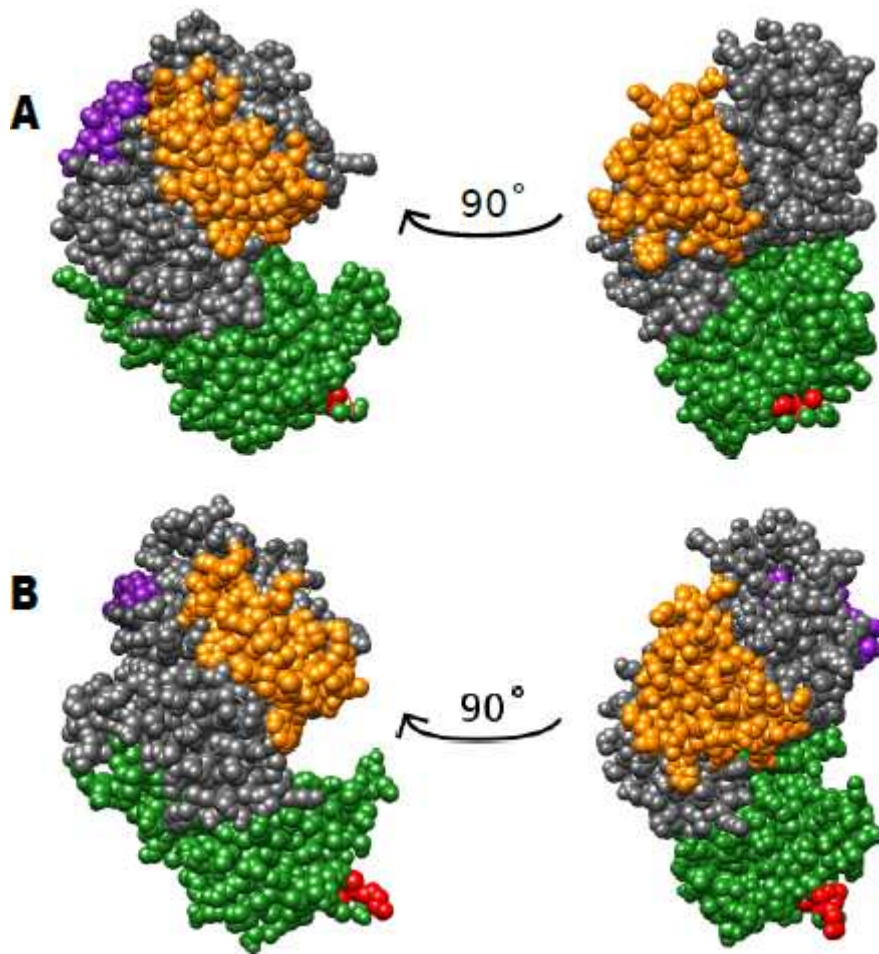
Fig. 6. Predicted Cqm1 models using I-TASSER tool. Models of the wild Cqm1 (A) and the mutant Cqm1 MutPATGGG (B), are represented by ribbons diagram (left) with a highlighted view of the specific residues mutated (right), localized to a single loop within the protein's structure.



Supplementary Fig. 1. Detection of α -glucosidase activity from samples of recombinant Cqm1 (10 μ g) and Aam1 (5 μ g) proteins. This activity was also determined from Cqm1 samples which were pre-incubated with the Binary toxin (Cqm1-Bin). Equivalent protein amounts of midgut brush border microvilli samples (BBMF) from larvae were used as controls.



Supplementary Fig. 2. Analysis of the interaction between different mutant Cqm1 proteins and BinB-GST, evaluated through pull-down assay and immunoblotting. Wild-type Cqm1 and mutant proteins mutated in selected amino acids (MutNLT, MutAMQDF, MutRY) were incubated with BinB-GST or GST (negative control) proteins immobilized on Glutathione-sepharose beads. Bound proteins were separated on 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and submitted to immunodetection with the anti-Cqm1 antibody. P. Protein load equivalent to the amount incubated with the BinB-GST or GST only samples. The arrows show the immunodetection of Cqm1 and all mutant proteins bound to BinB. MW. Molecular weight markers (kDa).



Supplementary Fig. 3. Predicted Cqm1 models using I-TASSER tool, shown in atoms/bonds diagram. (A) Wild-type Cqm1 and (B) Mutant MutPATGGG. The models highlight the $_{155}\text{PATGGG}_{160}$ and $_{158}\text{GG}_{160}$ residues (red), the S129-A312 segment (green), the V393-Q458 segment (yellow) and the protein's C-terminus (purple). Left and right panels of each protein differ by a 90° counter-clockwise turn.

Table 1

Cqm1 mutant proteins targeted by site-directed mutagenesis to replace the selected residues (underlined) for those found in within the corresponding sequence from its Aam1 ortholog.

Cqm1 region	Cqm1 mutants	Original residues	Mutated residues
Glycosilation site	MutNLT	102 <u>NLT</u> ₁₀₄	<u>TLE</u>
129S-A312	MutVVRD	140 <u>VVRD</u> _{143*}	<u>AERN</u>
	MutPE	144 <u>PE</u> ₁₄₅	<u>ET</u>
	MutPATGGG	155 <u>PATGGG</u> ₁₆₀	<u>AETGKL</u>
	MutPA	155 <u>PA</u> ₁₅₆	<u>AE</u>
	MutGG	159 <u>GG</u> ₁₆₀	<u>KL</u>
	MutNQA	177 <u>NQA</u> ₁₇₉ *	<u>HEG</u>
	MutGEY	181 <u>GEY</u> ₁₈₃	<u>QEF</u>
	MutEQ	233 <u>EQ</u> ₂₃₄	<u>PE</u>
	MutGQ	244 <u>GQ</u> ₂₄₅	<u>SD</u>
	MutPDVYD	261 <u>PDVYD</u> ₂₆₂	<u>EDVYK</u>
	MutQMDK	273 <u>QMDK</u> ₂₇₆	<u>LMDT</u>
	MutS	304 <u>S</u>	<u>N</u>
	MutDRK	306 <u>DRK</u> ₃₀₈	<u>NRT</u>
327E-D372	MutE	327 <u>E</u>	<u>I</u>
	Mut A	354 <u>A</u>	<u>S</u>
	MutSV	360 <u>SRV</u> ₃₆₂	<u>ERF</u>
	MutLDRVD	368 <u>LDRVD</u> ₃₇₂	<u>ENRVE</u>
393V-Q458	MutAMQDF	394 <u>AMQDF</u> ₃₉₈	<u>GMLDY</u>
	MutQFDN	403 <u>QFDN</u> ₄₀₆	<u>TYDG</u>
	MutSS	418 <u>SS</u> ₄₁₉	<u>GT</u>
	MutTNTWLR	428 <u>TNTWLR</u> ₄₃₃	<u>ATTWK</u>
	MutRY	440 <u>RY</u> ₄₄₁	<u>SL</u>
	MutKNP	448 <u>KNP</u> ₄₅₀	<u>NAE</u>
	MutT	453 <u>T</u>	<u>H</u>
	MutQH	458 <u>QH</u> ₄₅₉	<u>RA</u>
473E-E537	MutEYV	473 <u>EYV</u> ₄₇₅	<u>DFL</u>
	MutKS	531 <u>KS</u> ₅₃₂	<u>TL</u>
	Mut <u>E</u> V	537 <u>E</u>	<u>V</u>

* Variation observed in the *cqm1* sequence of larvae from the CqSf colony, that was used to perform site-direct mutagenesis, compared to the reference sequence (GenBank accession [ABC59609.1](#)).

7.2 Resultados complementares ao artigo 2

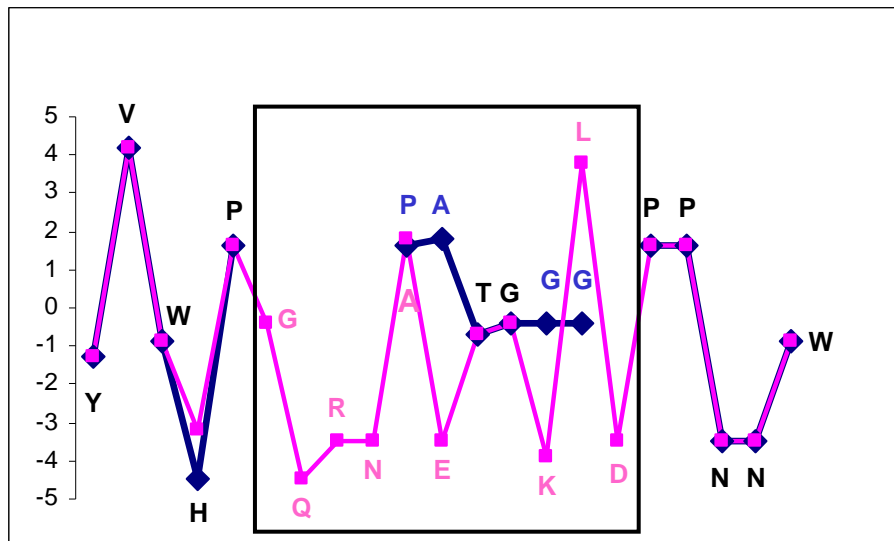
Além dos dados obtidos no artigo 2, outras análises *in silico* foram realizadas, a fim de complementar as informações acerca da identificação de epítomos de ligação à toxina Bin no receptor Cqm1. Foi realizada uma análise do perfil de hidropatia dos aminoácidos da região não conservada, que foi identificada como epítomo da toxina Bin. Além disso, foi realizada a modelagem das proteínas Cqm1, Aam1 e suas respectivas proteínas mutantes, baseado nos dados da identificação do epítomo na Cqm1, para avaliar possíveis alterações estruturais que interfiram na afinidade à toxina Bin.

7.2.1 Análise do perfil de hidropatia do epítomo Cqm1

O perfil de hidropatia de uma proteína leva em consideração características como hidrofobicidade e hidrofobicidade dos aminoácidos que compõem as moléculas e permite determinar a tendência destes aminoácidos na cadeia polipeptídica de interagirem com outras moléculas. Cada aminoácido apresenta um valor numérico que corresponde ao seu índice hidropático e assim é possível identificar regiões da proteína que se encontram mais ou menos expostas na estrutura (KYTE; DOOLITTLE, 1982). Adicionalmente, alguns estudos demonstraram que existe uma complementaridade hidropática entre sequências de alguns ligantes e seus receptores biológicos (BOQUET et al., 1995).

A partir da identificação de uma região pouco conservada entre as proteínas Cqm1 e Aam1, onde foi mapeado um epítomo de ligação à toxina na Cqm1, foi realizada uma comparação dos perfis de hidropatia nesta região (KYTE; DOOLITTLE, 1982). O perfil de um grupo de 16 e 21 aminoácidos das proteínas Cqm1 e Aam1, respectivamente, está apresentado na figura 15. As regiões adjacentes ao epítomo estão representadas, cada uma, por um grupo de cinco aminoácidos altamente conservados. Em destaque está representado o spot não conservado e cujo índice hidropático é discrepante entre as proteínas, sobretudo os resíduos $_{155}\text{PA}_{156}$ e $_{159}\text{GG}_{160}$ da Cqm1 em relação aos resíduos $_{158}\text{AE}_{159}$ e $_{162}\text{KL}_{163}$ da Aam1. Além disso, a sequência de Aam1 está ladeada pela inserção de cinco aminoácidos que não ocorrem na proteína Cqm1, e que também contribuem para o padrão distinto observado.

Figura 15 - Perfil hidropático dos aminoácidos de um spot pouco conservado (sublinhado) entre Cqm1 (azul) e Aam1 (rosa).



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: O retângulo delimita resíduos não conservados e a inserção de aminoácidos encontrados apenas na sequência da Aam1. Cqm1_{(150)YVWRPPATGGGPPNNWW₁₆₅} e Aam1_{(149)YVWHPGRQNAETGKLDPPNNW₁₆₉}.

7.2.2 Modelagem das proteínas Cqm1 e Aam1

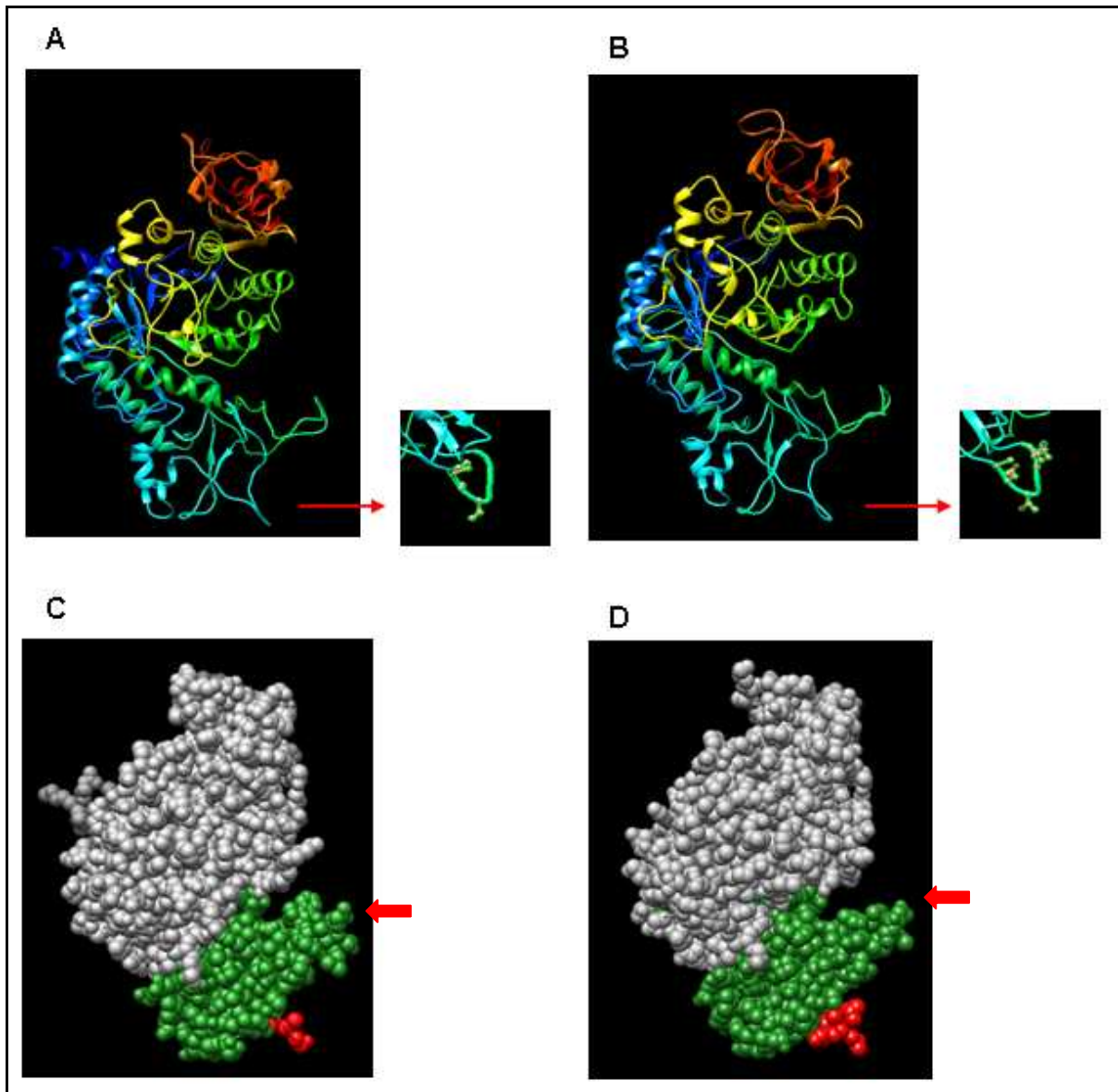
A partir dos dados obtidos no artigo 2, acerca dos aminoácidos críticos para a interação da Cqm1 com a toxina Bin, foi realizada a modelagem da proteína Cqm1 na sua forma selvagem e mutante nos aminoácidos $_{155}PATGGG_{160}$, identificados como essenciais para a ligação. Também foi realizada a modelagem da proteína Aam1 selvagem, e de sua variante mutante, na região correspondente ao epítipo identificado na Cqm1. Além disso, foi realizada a modelagem da proteína Cqm1 contendo a deleção de 66 aminoácidos encontrada na proteína Cpm1_{BP-del}, o que pode fornecer informações acerca da conformação e das regiões críticas para a interação com a toxina Bin. A realização dessas análises permitiu comparar as proteínas Cqm1 e Aam1, bem como as proteínas selvagens e mutantes e inferir como os aminoácidos estão organizados na conformação terciária da molécula. As análises de modelagem foram realizadas pelo Dr. Antônio M. Rezende do Departamento de Microbiologia do CPqAM, colaborador deste projeto. As proteínas foram modeladas estruturalmente através da ferramenta I-TASSER (*Iterative Threading Assembly Refinement*) (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010) e visualizadas, conforme descrito em FERREIRA et al. (2014).

Os dados de modelagem demonstraram que a proteína Cqm1 mutante (Figura 16, B) quando comparada com a proteína selvagem (Figura 16, A) apresenta diferenças na disposição dos aminoácidos na região de alça onde foram identificados os resíduos críticos para a ligação com a toxina Bin. Em destaque pode ser observada a grande divergência das cadeias dos aminoácidos $_{155}\text{PA}_{156}$; $_{159}\text{GG}_{160}$ da Cqm1 em relação aos aminoácidos inseridos $_{158}\text{AE}_{159}$; $_{162}\text{KL}_{163}$ da Aam1 (Figura 16 A e B). Além disso, verificou-se que na proteína Cqm1 mutante nos aminoácidos $_{155}\text{PA}_{156}$ e $_{159}\text{GG}_{160}$, ocorrem modificações em áreas adjacentes que apresentam aminoácidos divergentes entre Cqm1 e Aam1 (Figura 16, C e D). A região de alça da proteína Aam1, onde se encontra o motivo $_{158}\text{AETGKL}_{163}$ é bem divergente da Cqm1 (Figura 17, A e C), entretanto, a modelagem da proteína Aam1 mutante nessa região, contendo os aminoácidos da Cqm1, mostra uma redução desta divergência (Figura 17, B e D) e uma disposição de aminoácidos mais semelhante.

Uma avaliação dos sítios de glicosilação na Cqm1 demonstrou que o único sítio exclusivo se encontra em uma região exposta da molécula na proteína (Figura 18, A). Esta modelagem mostra que os sítios $_{127}\text{NHS}_{129}$ e $_{410}\text{NRT}_{412}$ possuem um impedimento físico para a inserção de glicosilações, enquanto que o sítio $_{102}\text{NLT}_{104}$ está em uma localização acessível. No entanto, mesmo que haja glicanos, a análise da proteína mutante Cqm1_MutNLT exclui a sua participação na ligação à toxina. A visualização dos seis sítios de glicosilação da Aam1 mostra que quatro estão em regiões expostas e dois mais internamente na molécula (Figura 18, B). Esses dados estão de acordo com as análises *in vitro* que demonstraram a presença de carboidratos nestes quatro sítios de glicosilação da Aam1, que a modelagem mostra estarem expostos na proteína.

A modelagem da proteína Cqm1 modificada, com os 66 aminoácidos deletados da proteína Cpm1_{BP.del}, demonstrou que a região de alça onde se encontra o motivo $_{159}\text{GG}_{160}$, sofre alterações, bem como que a região S129-A312 apresenta uma disposição diferente, apesar da deleção não ser nesse trecho (Figura 19 A-D). No entanto, essas mudanças podem ser decorrentes do desenovelamento da proteína, dada a perda de um número elevado de aminoácidos.

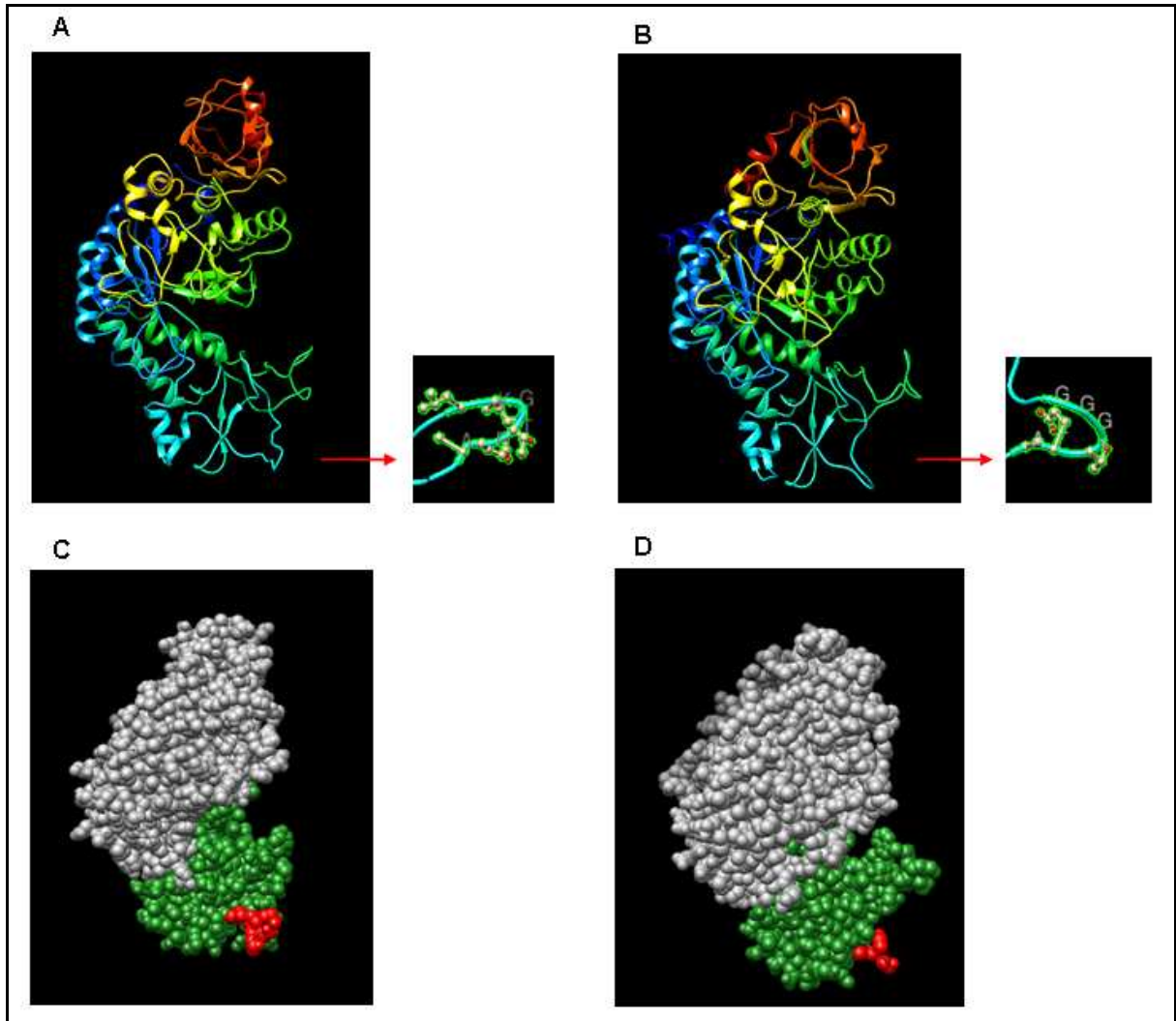
Figura 16 - Modelagem das proteínas Cqm1 selvagem (A, C) e mutante no sítio $_{155}\text{PATGGG}_{160}$, substituído pelos aminoácidos da Aam1 ($_{158}\text{AETGKL}_{163}$) (B, D).



Fonte: Elaborada pela autora.

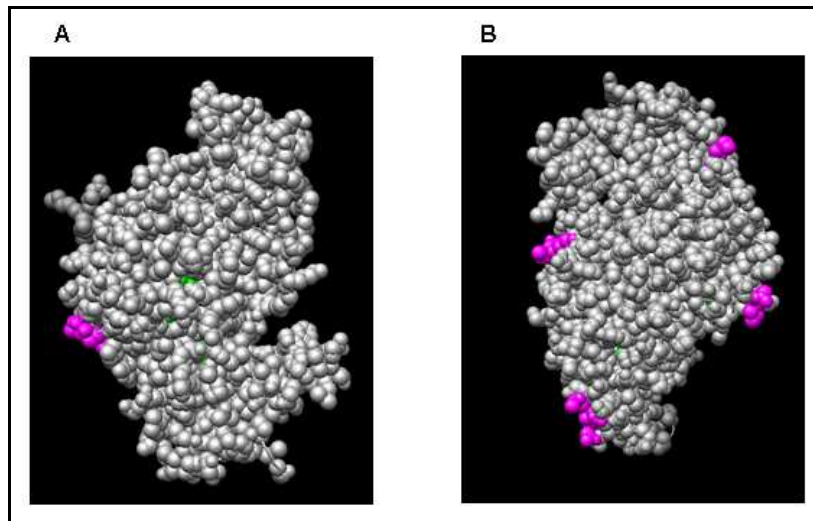
Nota: A e B. Representação ampliada da disposição dos aminoácidos na região crítica da Cqm1. C e D. Representação da região S129-A312 (verde) e dos aminoácidos $_{155}\text{PATGGG}_{160}$ (C) e $_{158}\text{AETGKL}_{163}$ (D) (vermelho). Seta larga. Região adjacente alterada pela modificação no sítio $_{155}\text{PATGGG}_{160}$. A modelagem foi realizada através da ferramenta I-TASSER e visualizada com o programa UCSF Chimera 1.8.1.

Figura 17 - Modelagem das proteínas Aam1 selvagem (A, C) e mutante no sítio $_{154}\text{GRQNAETGKLD}_{164}$, substituído pelos aminoácidos da Cqm1 ($_{155}\text{PATGGG}_{160}$) (B, D).



Fonte: Elaborada pela autora.

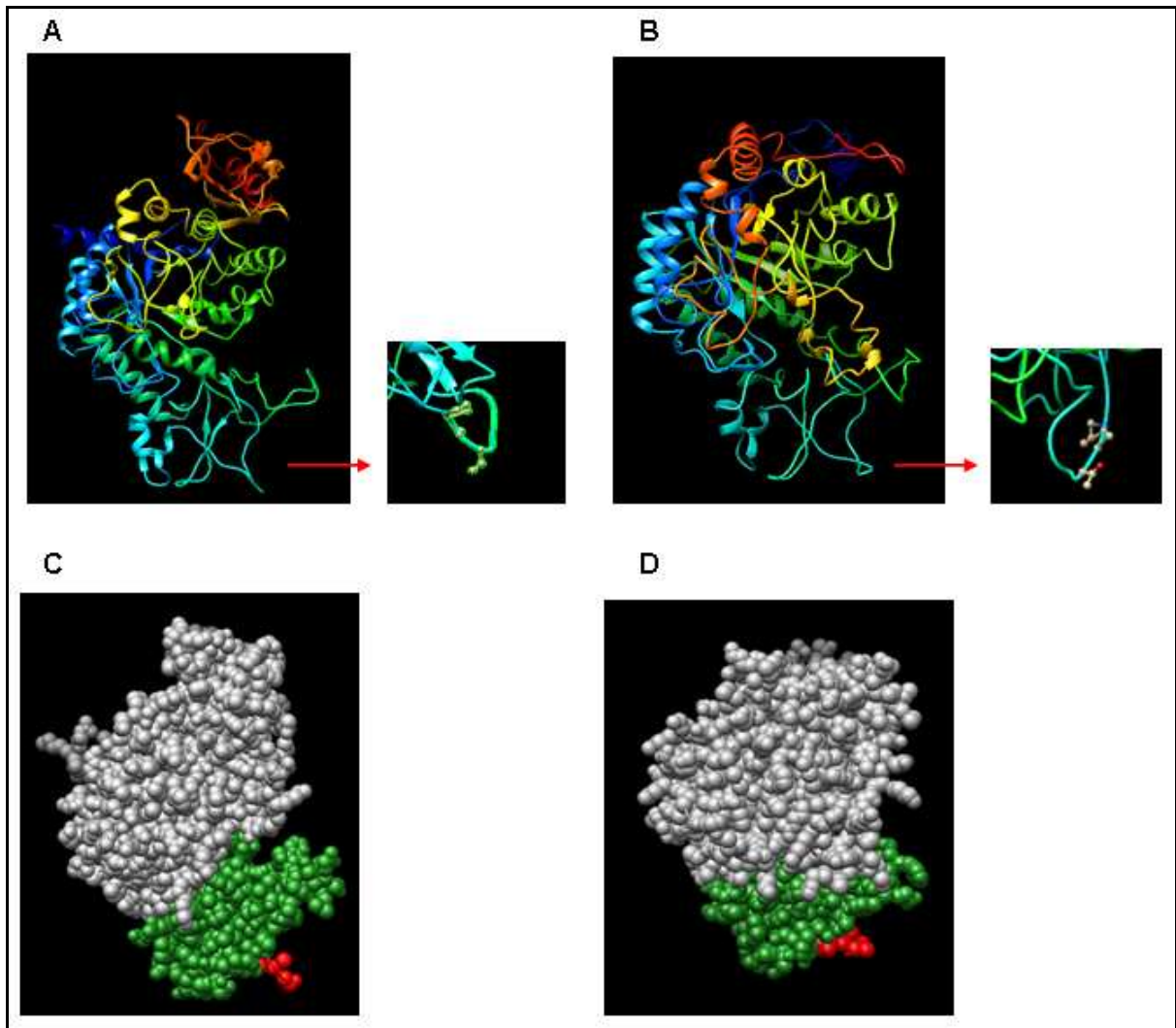
Nota: A e B. Representação ampliada da disposição dos aminoácidos na região correspondente aos aminoácidos críticos da Cqm1. C e D. Representação da região S129-A312 (verde) e dos aminoácidos $_{158}\text{AETGKL}_{163}$ (C) e $_{159}\text{PATGGG}_{160}$ (D) (vermelho). A modelagem foi realizada através da ferramenta I-TASSER e visualizada com o programa UCSF Chimera 1.8.1.

Figura 18 - Modelagem das proteínas Cqm1 e Aam1 selvagens e representação dos sítios de glicosilação.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: A. Sítios de glicosilação da Cqm1: $_{102}\text{NLT}_{104}$ (rosa); sítios $_{127}\text{NHS}_{129}$ e $_{410}\text{NRT}_{412}$ (verde). B. Sítios de glicosilação da Aam1: $_{126}\text{NHS}_{128}$, $_{310}\text{NRT}_{312}$, $_{431}\text{NAT}_{433}$ e $_{533}\text{NST}_{535}$ (rosa); sítios $_{126}\text{NHS}_{128}$ $_{414}\text{NRT}_{415}$ (verde). A modelagem foi realizada através da ferramenta I-TASSER e visualizada com o programa UCSF Chimera 1.8.1.

Figura 19 - Modelagem das proteínas Cqm1 selvagem (A, C) e mutante com a região V393-Q458 deletada, semelhante à proteína Cpm1_{BP.del} (B e D).



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: A e B. Representação ampliada da disposição dos aminoácidos na região correspondente aos aminoácidos críticos da Cqm1. C e D. Representação da região S129-A312 (verde) e dos aminoácidos ¹⁵⁹PATGGG₁₆₀ (vermelho). A modelagem foi realizada através da ferramenta I-TASSER e visualizada com o programa UCSF Chimera 1.8.1.

7.3 Sumário artigo 2 e resultados complementares

- a) A interação da Cqm1 com a toxina Bin é independente de glicanos;
- b) O sítio de ligação à toxina Bin e os sítios catalíticos da proteína Cqm1 não estão relacionados;
- c) Um sítio de ligação da toxina Bin no receptor Cqm1 foi identificado em uma região de alça da porção N-terminal da proteína e os resíduos $_{159}GG_{160}$ são críticos para a ligação com a toxina Bin;
- d) O epitopo identificado em Cqm1 caracteriza-se por um conjunto de resíduos não conservados, perfil hidropático divergente e ausência de resíduos em relação à Aam1. Este conjunto de características podem ser os determinantes para a capacidade de ligação destas moléculas à toxina Bin;
- e) É possível que outras regiões e resíduos de Cqm1 sejam necessários para a interação com a toxina Bin, além deste epitopo;

8 ARTIGO 3 - Bacterial larvicides for vector control: mode of action of toxins and implications for resistance

8.1 Apresentação

Esta seção consiste em um artigo de revisão, que aborda uma análise comparativa do modo de ação das toxinas dos biolarvicidas *Lysinibacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis israelensis* em larvas de culicídeos. Este artigo não contém resultados experimentais deste projeto e foi produzido no âmbito de uma disciplina do Doutorado em Saúde Pública, que tinha como produto final um artigo de revisão.

REVIEW ARTICLE

Bacterial larvicides for vector control: mode of action of toxins and implications for resistance

Lígia Maria Ferreira and Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha*

Department of Entomology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil

(Received 3 April 2013; returned 20 May 2013; accepted 28 June 2013)

Vector control can be an effective strategy to interrupt disease transmission and biolarvicides based on the entomopathogenic bacteria *Bacillus sphaericus*, and *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti) have been successfully used to control species of public health relevance from the genera *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* and *Simulium*. The most important feature of these agents is their ability to produce insecticidal proteins with selective action on the larval midgut. These protoxins are produced as crystals that, once ingested by larvae, are processed into active toxins, interact with receptors in the midgut epithelium and trigger cytopathological effects leading to larval death. *B. sphaericus* and Bti toxins share the initial steps of the mode of action; however, they interact with different midgut molecules. *B. sphaericus* presents a single larvicidal factor, the binary (Bin) toxin, whose action relies on the binding to one class of midgut receptors, while Bti crystals contain four protoxins (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa and Cyt1Aa), which display interactions with multiple midgut receptors. The mode of action of *B. sphaericus* displays a greater potential for resistance selection, compared to Bti, and, to date, there is no record of insect resistance to the latter, contrarily to *B. sphaericus*. The set of mosquitocidal toxins and their interaction with midgut target sites are described in this review, as well as the implications for the potential to select resistance amongst exposed populations. These biolarvicides have specific mode of action that rely on unique interactions and make them the most selective agents to control Diptera insects actually available.

Keywords: biolarvicides; vectors; *Bacillus sphaericus*; Bti; mode of action; resistance

Introduction

Vector borne diseases still represent an important burden in public health corresponding to around 17% of infectious diseases affecting the world population (Townson et al., 2005). Diseases transmitted by vectors are under expansion, such as dengue, which is the most important re-emerging arbovirus in tropical and subtropical countries (Guzman et al., 2010; Kyle & Harris, 2008). Vector control is an effective tool for breaking the cycle of pathogen transmission to humans; however, biological features of Culicidae such as reproductive rate, short life cycle and high capacity to colonise temporary habitats make reduction of the population density a difficult task. In order to overcome these factors, mosquito control

*Corresponding author. Email: mhneves@cpqam.fiocruz.br

programmes have adopted the integrated use of environmentally safe strategies to achieve sustainable impact on mosquito populations. The use of biolarvicides based on entomopathogenic bacteria can be an effective tool in such programmes because of their selective insecticidal action to some Diptera species.

Bacillus sphaericus and *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti) have been successfully used for controlling mosquitoes and black flies worldwide, as reviewed by Lacey (2007). Both are Gram-positive and cosmopolitan bacteria occurring in soil and aquatic environments, and they are characterised by the production of protein crystals containing protoxins with high and selective action against larvae from some species of *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* and *Simulium* (Lacey, 2007). Their mode of action comprises a set of sequential steps which start with the ingestion of crystals by larvae in the aquatic environment, crystal solubilisation, release of protoxins in the alkaline pH from the intestinal lumen, followed by their activation into toxins by serine proteases. Toxins interact with specific receptors in midgut epithelium cells and trigger cytopathological changes which are followed by larval death (Charles, 1987; Charles & de Barjac, 1983). The main feature that confers the selectivity displayed by these agents is the capacity of their insecticidal proteins to recognise and interact with receptors located in the larval midgut. Early studies have demonstrated that specific binding of toxins to receptors is a *sine qua non* condition for the larvicidal activity of entomopathogenic bacteria (Nielsen-Leroux & Charles, 1992; Van Rie, Jansens, Hofte, Degheele, & Van Mellaert, 1990). The set of toxins produced by *Bacillus sphaericus* and Bti, as well as the midgut molecules which act as their receptors, play essential roles in their selective mode of action.

The mosquitoicidal property of *B. sphaericus* was first identified in *Culiseta incidens* larvae (Kellen et al., 1965); however, the strain involved had low larvicidal activity. The discovery of high-toxicity strains, isolated in the 1980s, including 1593 identified in Indonesia, 2297 from Sri Lanka, 2362 from Nigeria and C3-41 from China, led to the large-scale production of *B. sphaericus*-based larvicides (Singer, 1977; Weiser, 1984; Wickremesingue & Mendis, 1980; Yuan, Zhang, & Liu, 2000). These strains are characterised by the production of parasporal crystals which contain binary (Bin) protoxins (Charles, Nielsen-LeRoux, & Delecluse, 1996). After larval ingestion and midgut processing, the active Bin toxins exhibit high larvicidal activity against some species of Culicidae, through their specific binding to a single class of midgut receptors (Davidson, 1988, 1989; Nielsen-Leroux & Charles, 1992).

Bti was isolated from cadavers of *Culex* larvae in Israel in 1977, serotyped as H14 strain, and its insecticidal properties to Diptera larvae were subsequently characterised (de Barjac, 1978; Goldberg & Margalit, 1978). Soon after its discovery, Bti was introduced in 1982 for large-scale field application, in the Onchocerciasis Control Program to fight *Simulium* vectors responsible for the transmission of river blindness in many West African countries (Guillet, Kurtak, Phillipon, & Meyer, 1990; Hougard & Seketeli, 1998). Since the 1980s, it has been adopted for controlling Simuliidae and Culicidae larvae worldwide. Bti products have been based on strains that produce four major toxins, three from the three-domain crystal toxins (Cry11Aa, Cry4Aa, Cry4Ba) and one cytolytical toxin (Cyt1Aa) (Berry et al., 2002; Thomas & Ellar, 1983). These toxins act in synergy and bind to multiple receptors in order to provide maximum toxicity (Likitvivanavong et al., 2011; Soberón, Fernández, Pérez, Gill, & Bravo, 2007).

In this article the current knowledge about the interaction of these insecticidal toxins with midgut receptors from mosquito larvae is summarised, and it considers the peculiarities of the mode of action of these biolarvicides and the implications for the selection of resistance.

Bacillus sphaericus

Biolarvicides based on this bacterium have been successfully used worldwide and their major targets are species within *Culex* and *Anopheles* (Barbazan et al., 1997; Kumar, Sharma, Sumodan, Thavaselvam, & Kamat, 1994; Lacey, Heitzman, Meisch, & Billodeaux, 1986; Mulla et al., 2001; Regis et al., 1995; Skovmand et al., 2009; Skovmand & Sanogo, 1999; Yuan et al., 2000). Because of its potential for mosquito control, many isolates have been characterized, and these can be grouped into serotypes based on differences in flagellar antigen epitopes H. Five groups (I–V) based on DNA homologies were identified, and nine serotypes of IIA group correspond to the strains with larvicidal activity (Alexander & Priest, 1990). Among these, the most important are the H5a5b that comprise 1593, 2362 and C3-41 strains, often employed for biolarvicide production. One of the major advantages of *B. sphaericus* is its persistence under field conditions, providing efficient control of *Culex pipiens* species whose oviposition sites are often characterised by water enriched in organic matter (Karch & Charles, 1987; Nicolas, Darriet, & Hougard, 1987). The *B. sphaericus* mode of action can favour the selection of resistance, if continuously used without the introduction of other agents with a different mode of action.

Insecticidal toxins

Three classes of toxins with mosquitocidal activity for Diptera have been identified in *B. sphaericus*: the binary (Bin) toxin, the mosquitocidal toxins (Mtx's) and a second binary toxin formed by Cry48Aa/Cry49Aa components. These toxins are characterised by their specific and narrow spectrum of action against some culicine larvae. The Bin toxin is the first and major insecticidal factor identified to date, and its features are described in the following section. Another class of insecticidal toxin, the sphaericolysin (53 kDa), was recently identified in a strain lacking the known mosquitocidal toxins (Nishiwaki, Nakashima, Ishida, Kawamura, & Matsuda, 2007). This is a haemolytic toxin with pore-forming action and is able to show high toxicity when injected in *Blatella germanica* and *Spodoptera litura*. The properties of *B. sphaericus* as an entomopathogen were recently reviewed by Berry (2012).

Mtx's are produced during the bacterial vegetative phase and are classified as Mtx1 (100 kDa), Mtx2 (31 kDa) and Mtx3 (35 kDa) (Liu, Porter, Wee, & Thanabalu, 1996; Thanabalu, Hindley, Jackson-Yap, & Berry, 1991; Thanabalu & Porter, 1996). The Mtx1 shares sequence homology with other bacterial ADP-ribosyltransferases, and it has been the most studied. When processed by proteases from larval midgut, it will produce fragments of 27 and 70 kDa (Thanabalu, Hindley, & Berry, 1992), whose mechanism of action and binding to midgut receptors have not been elucidated yet. Previous studies have demonstrated that Mtx1 and Mtx2 are active against *Cx. quinquefasciatus* larvae which are resistant to Bin toxin indicating that these toxins do not share the same target sites in the larvae (Wei, Cai, Cai, & Yuan,

2007; Wirth, Yang, Walton, Federici, & Berry, 2007). Besides, Mtx1 and Mtx2 can improve the action of Bti toxins indicating synergistic interaction among some toxins (Wirth et al., 2007). In the native strains, the Mtx's toxins do not provide an important contribution to the larvicidal activity of sporulated cultures, since they are secreted in the vegetative phase and are likely to be degraded by proteases (Charles et al., 1996; Thanabalu et al., 1991). When Mtx toxins are expressed as recombinant proteins in *Escherichia coli* and other bacterial hosts, they can display high toxicity against some Diptera larvae indicating the biotechnological potential for the development of future biolarvices (Thanabalu, Hindley, Brenner, Oei, & Berry, 1992).

A second binary toxin formed by the Cry48Aa (135 kDa) and Cry49Aa (49 kDa) components, produced as small crystalline inclusions during sporulation, was identified in the IAB59 strain, and this is the only report of Cry-type toxins produced by *B. sphaericus* (Jones et al., 2007). Cry48Aa and Cry49Aa were classified as binary toxins since their optimal toxicity is achieved when both components, produced as recombinant and purified proteins, were administered at equimolar concentrations to *Cx. quinquefasciatus* larvae. Under these conditions, Cry48Aa/Cry49Aa presented an activity level comparable to the Bin toxin, while in the native strain IAB59 the expression of these proteins is characterised by a low level of accumulation of Cry48Aa; thus, high toxicity cannot be achieved. Studies using the respective recombinant purified proteins showed that the Cry48Aa/Cry49Aa has a narrow spectrum of action since bioassays failed to demonstrate susceptibility of other culicine species like *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*, and toxicity remained restricted to *Culex* spp larvae (Jones, Wirth, Monnerat, & Berry, 2008). Screening of insecticidal activity towards agricultural pests as *Spodoptera frugiperda* and *Anthonomus grandis* were also unfruitful. Investigation of the mode of action performed in *Cx. quinquefasciatus* larvae showed that the toxin requires midgut proteolytic processing to the active form and seems to interact with a class of target sites that are probably different from those identified for the Bin toxin, since Cry48Aa/Cry49Aa displays toxicity against *B. sphaericus*-resistant larvae lacking midgut receptors for the Bin toxin (de Melo et al., 2009; Jones et al., 2007). Similar cytopathological effects were recorded in midgut epithelial cells of susceptible and Bin-resistant larvae intoxicated with Cry48Aa/Cry49Aa, confirming the lack of cross-resistance of these toxins (de Melo et al., 2009).

It is worth noting that this new Bin toxin shows a unique composition of the Cry48Aa which is a typical three-domain Cry toxin while Cry49Aa is a Bin-like toxin as Cry35A, Cry36A and the Bin toxin itself (Jones et al., 2007). The mode of action of Cry48Aa/Cry49Aa is still unknown, but the cytopathological effects observed in midgut epithelial suggested a combined action of Cry-like and Bin-like toxins, since they were similar to those observed when larvae were experimentally exposed to a synergistic mixture of Cry11Aa and Bin toxins (de Melo et al., 2009).

Bin toxin

The crystals containing the Bin toxin are the active principle of the commercial products based on this bacterium, and its larvicidal activity has been reported for *Culex*, *Anopheles*, *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Psorophora* and *Mansonia* larvae. Species from the *Culex pipiens* complex are considered the most susceptible group,

anophelines as *Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi* and *Anopheles sinensis* can also be efficiently controlled by *B. sphaericus*, while significant variations on the susceptibility are found amongst *Aedes* spp. (Charles et al., 1996; Lacey, 2007). *Aedes atropalpus*, *Aedes nigromaculatis* and *Aedes vexans* are susceptible while *Aedes aegypti* is considered refractory to Bin toxin, since the lethal concentration for this species is around 100 times higher than that for *Cx. pipiens* larvae (Berry et al., 1993; Nielsen-Leroux & Charles, 1992).

Bin protoxin is produced inside large crystalline inclusions during bacterial sporulation and is a heterodimer composed of two polypeptides BinA (42 kDa) and BinB (51 kDa) whose optimal activity is only achieved when both components are present, which characterises its binary nature (Broadwell, Clark, Baumann, & Baumann, 1990; Charles, Silva-Filha, Nielsen-LeRoux, Humphreys, & Berry, 1997; Nicolas, Nielsen-Leroux, Charles, & Delécluse, 1993). Genes encoding the subunits are located on the bacterial chromosome, and sequence alignment of BinA and Bin displays 25% identity and 40% similarity while they do not present similarity to any Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* (Charles et al., 1996). Sequences of both subunits are highly conserved, and variations of few amino acids found amongst them were used to classify four major types of Bin toxins which are: Bin1 (IAB59 and 1593 strains), Bin2 (2362 strain), Bin3 (2297 strain) and Bin4 (LP1-G strain) (Humphreys & Berry, 1998). A single substitution of an alanine by a serine at position 93 of the BinA4 sub-unit is the most important variation since it was found to be the reason behind the low toxicity displayed by the strain LP1-G (Yuan et al., 2001). Bin1 and Bin2 are the Bin toxins produced by the strains used for industrial production, and studies on mode of action of these specific toxins show that they display comparable larvicidal activity and capacity to bind to midgut receptors (Silva-Filha et al., 2004).

As described, Bin toxin action depends on equimolar amounts of each sub-unit in order to achieve the maximum level of toxicity. In this purpose, BinA and BinB are cleaved by serine proteases into active polypeptides of 39 and 43 kDa, respectively, and these are able to bind to each other as well as to the midgut receptors, through specific regions (Baumann et al., 1985; Broadwell & Baumann, 1987). The three-dimensional structure of Bin is not available yet, and this toxin is not related to any other whose structure has been solved. Analysis of the secondary structure, based on circular dichroism, has indicated that Bin sub-units have mainly β -structure (Boonserm et al., 2006; Hire, Hadapad, Dongre, & Kumar, 2009; Srisucharitpanit, Inchana, Rungrod, Promdonkoy, & Boonserm, 2012). Investigation of functional domains has shown that BinB recognises and binds to the midgut receptors, determining the specificity of the toxin, while BinA plays a role in cell toxicity (Charles et al., 1997; Nicolas et al., 1993). BinB binds to the Cqm1 receptors from *Cx. quinquefasciatus* through its *N*-terminal in a region mapped between amino acids 33 and 158, and two binding motifs, 85IRF87 and 147FQF149, were found to be critical for this interaction (Romão, de-Melo-Neto, & Silva-Filha, 2011). The *C*-terminal of BinB contains regions which are needed for the interaction with BinA, although it has been claimed that residues from the *N*-terminal could also be required (Elangovan, Shanmugavelu, Rajamohan, Dean, & Jayaraman 2000; Oei, Hindley, & Berry, 1990; Shanmugavelu et al., 1998). BinA is responsible for the toxic action to midgut cells, whose optimal action requires the presence of BinB to recognise and bind to the midgut receptors (Charles et al., 1997). The functional

domains of BinA have been characterized, and toxicity seems to be associated to the C-terminal region while, similarly to BinB, both N- and C-termini seem to be involved in BinA–BinB interaction (Elangovan et al., 2000; Limpanawat, Promdonkoy, & Boonserm, 2009; Oei, Hindley, & Berry, 1992; Sanitt, Promdonkoy, & Boonserm, 2008). Undergoing studies to reveal the structure of this toxin will certainly bring new insights to the understanding of its functional domains (Srisucharitpanit et al., 2013).

Midgut cells from larvae treated with Bin toxin show cytopathological effects, and the most prominent include microvilli damage, mitochondrial swelling, reticulum fragmentation and an intense cytoplasmic vacuolation (Charles, 1987; de Melo, Vasconcelos, Furtado, Peixoto, & Silva-Filha, 2008; Silva-Filha & Peixoto, 2003; Singh & Gill, 1988). Recent studies have shown that after Bin binds to its Cqm1 receptor in *Cx. pipiens* midgut, the toxin–receptor complex is internalised by endocytosis and the intense vacuolation observed in treated cells is a transient step towards a process of cell autophagy in response to the intoxication (Opota et al., 2011). These are important insights in the mode of action of Bin toxin, although the complete mechanism underlying larval death has not yet been fully elucidated.

Receptors of the Bin toxin

B. sphaericus action relies on the binding of Bin toxin, through the BinB sub-unit, to a single class of specific receptors present in midgut cells of susceptible larvae (Nielsen-Leroux & Charles, 1992). Bin toxin binding to midgut microvilli fractions has been demonstrated in *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, *An. stephensi* and *An. gambiae* (Nielsen-Leroux & Charles, 1992; Silva-Filha, Nielsen-Leroux, & Charles, 1997). In *Cx. pipiens* larvae, Bin toxin shows regionalised binding to gastric caeca and posterior stomach, while in *Anopheles*, the binding showed a weaker distribution along the entire midgut (Davidson, 1988, 1989). The binding affinity to receptors, represented by the dissociation constant (K_d) of the toxin–receptor complex, seems to be directly correlated with larval susceptibility. Therefore, in larvae of *Cx. pipiens*, Bin binds with high affinity to a single class of receptors ($K_d \approx 10\text{--}20$ nM) while affinity is lower in *Anopheles* species, which are less susceptible to *B. sphaericus* (Nielsen-Leroux & Charles, 1992; Nielsen-Leroux et al., 2002; Silva-Filha et al., 1997; Silva-Filha et al., 2004; Silva-Filha et al., 2008). In *Ae. aegypti*, a naturally refractory species, the level of specific binding to midgut receptors is very low (Nielsen-Leroux & Charles, 1992).

Bin toxin receptors in *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* and *An. gambiae* are ortholog α -glucosidases (EC 3.2.1.20) of around 60 kDa, bound to the apical membrane of epithelial cells by a glycosyl–phosphatidylinositol (GPI) anchor (Darboux, Nielsen-LeRoux, Charles, & Pauron, 2001; Opota, Charles, Warot, Pauron, & Darboux, 2008; Silva-Filha, Nielsen-LeRoux, & Charles, 1999). These proteins named ‘*Cx. pipiens* maltase 1’ (Cpm1), ‘*Cx. quinquefasciatus* maltase 1’ (Cqm1) and ‘*An. gambiae* maltase 3’ (Agm3) (Table 1) share a high degree of conservation. Cpm1 and Cqm1 display 97% identity while the level in other dipteran orthologs is 74%, 66% and 65% for *Ae. aegypti*, *An. gambiae* and *Drosophila melanogaster*, respectively (Ferreira, Romão, de-Melo-Neto, & Silva-Filha, 2010; Romão et al., 2006). These are conserved molecules that play a major physiological role in carbohydrate digestion, being responsible for hydrolysis of the α -1-4 links

Table 1. Receptors of *Bacillus sphaericus* (Bsp) and *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti) toxins characterised in the midgut of Culicidae larvae.

Agent	Toxin	Receptor		Species	References
		Class	Mass (kDa)		
Bsp	Bin	GLU (Cpm1)	61	<i>Culex pipiens</i>	Silva-Filha et al. (1999), Darboux et al. (2001)
		GLU (Cqm1)	61	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Romão et al. (2006)
		GLU (Agm3)	61	<i>Anopheles gambiae</i>	Opota et al. (2008)
Bti	Cry11Aa	CADR (AaeCad)	250	<i>Aedes aegypti</i>	Chen et al. (2009a)
		ALP (ALP1)	65	<i>Aedes aegypti</i>	Fernandez et al. (2005, 2006, 2009)
		APN (AaeAPN1)	140	<i>Aedes aegypti</i>	Chen et al. (2009b)
		APN (AaeAPN2)	95	<i>Aedes aegypti</i>	Chen et al. (2009b)
		AMY	70	<i>Anopheles albimanus</i>	Fernandez-Luna et al. (2010)
Bti	Cry4Ba	CAD (AgCad1)	200	<i>Anopheles gambiae</i>	Hua et al. (2008)
		ALP (ALP1)	65	<i>Aedes aegypti</i>	Deckklar et al. (2011)
		APN	–	<i>Aedes aegypti</i>	Bayyareddy et al. (2009), Saengwiman et al. (2011)
		AMY (Aamy1)	70	<i>Anopheles albimanus</i>	Fernandez-Luna et al. (2010)

Note: GLU, α -glucosidase; CADR, cadherin; ALP, alkaline phosphatase; APN, aminopeptidase; AMY, α -amylase.

between glucose residues (Krasikov, Karellov, & Firsov, 2001). Previous work has shown that *Ae. aegypti* larvae produce the Aam1 α -glucosidase with 80% similarity to Cqm1 and is expressed as a midgut GPI-anchored protein, in a similar fashion as Cqm1 from *Cx. quinquefasciatus* (Ferreira et al., 2010). Binding assays between Bin toxin and midgut microvilli fraction enriched with Aam1 molecules confirmed the lack of specific receptors in *Ae. aegypti* larvae. Differences in these ortholog sequences seem to be determinant for their ability to bind to the Bin toxin and glycosylation is an important post-translational modification found between proteins since Cqm1 (≈ 61 kDa) does not seem to be glycosylated, while Aam1 has an increased molecular mass (≈ 73 kDa) as a result of the presence of carbohydrates associated to this protein. The removal of glycosylations from Aam1 did not change its low capacity of binding to Bin toxin, and the role played by these glycans remains to be investigated, as well as other differences in their primary sequence and folding (Ferreira et al., 2010).

Regardless of the primordial role of Cqm1 in carbohydrate digestion, some features of this protein are critical in order to fulfil its 'secondary' function as the receptor for the Bin toxin. Firstly, Cqm1 molecules have to be located on the surface of the midgut epithelium, a condition that is assured by the presence of C-terminal

signalling sequences for the GPI anchor (Darboux et al., 2002). The conformational state of Cqm1 is also an essential condition since denatured Cqm1 samples failed to bind to Bin toxin, contrasting with some midgut receptors of *B. thuringiensis* toxins whose native state is not critical for its binding ability (Ferreira et al., 2010; Nagamatsu et al., 1998).

Resistance

Resistance has been considered one of the major obstacles to the effectiveness of insecticides employed in control programmes. The mode of action of *B. sphaericus* depends on one toxin that targets a single class of receptors, and this condition is more favourable to resistance selection compared to Bti which has a more complex mode of action, as described in the following section. Larval resistance has been recorded in *Cx. pipiens* from selected laboratory colonies (Amorim, Oliveira, Rios, Regis, & Silva-Filha, 2007; Pei et al., 2002; Wirth, Georghiou, Malik, & Abro, 2000) and field-treated populations (Mulla, Thavara, Tawatsin, Chomposri, & Su, 2003; Nielsen-Leroux et al., 2002; Rao et al., 1995; Silva-Filha, Regis, Nielsen-LeRoux, & Charles, 1995; Yuan et al., 2000). Among some resistance cases already investigated, the most frequent mechanism is associated with the lack of functional receptors in midgut microvilli caused by the disruption of the GPI anchor, or loss of the integrity of the binding epitopes (Table 2). It is important to note that two field-treated populations (SPHAE, TUNIS), whose larvae displayed high resistance levels to *B. sphaericus*, showed functional Cqm1 receptors, indicating that other pathways can be involved in this process, although these remain unknown (Nielsen-Leroux et al., 1997; Nielsen-Leroux et al., 2002).

Molecular approaches to elucidate the resistance associated with the lack of midgut receptors have shown that mutations in *cpml* and *cqml* genes can code proteins that are unable to bind to the Bin toxin, conferring a status of complete refractoriness (Table 2). These, as other alleles associated to *B. thuringiensis* resistance, are recessively inherited and the characterisation of the molecular basis of resistance becomes a crucial step for the development of molecular diagnostic tools (Amorim et al., 2007; Oliveira et al., 2004; Tabashnik, Finson, Johnson, & Moar, 1993; Tabashnik et al., 2002; Tabashnik et al., 2003). To date, six alleles of the *cpml/cqml* genes associated to resistance have been described in *Cx. pipiens* larvae from laboratory-selected colonies (*cpml*_{GEO} and *cqml*_{REC}) and field populations (*cpml*_{BP}, *cpml*_{BP-del}, *cqml*_{REC-D16} and *cqml*_{RECD-25}). The alleles show non-sense mutations (*cpml*_{GEO} and *cpml*_{BP}) or deletions (*cqml*_{REC}, *cqml*_{REC-D16} and *cqml*_{RECD-25}) that originate premature stop codons in the open reading frame of their sequences. These transcripts code truncated proteins lacking the GPI anchor, and, as a consequence, they are unavailable on the apical membrane of the epithelium (Chalegre et al., 2012; Darboux, Charles, Pauchet, Warot, & Pauron, 2007; Darboux et al., 2002; Romão et al., 2006). Another allele associated with resistance (*cpml*_{BP-del}) was characterised by the insertion of a transposon in the gene sequence whose transcript codes for a protein that, although GPI anchored, lacks 66 amino acids and is unable to bind to the toxin. Loss of this region certainly compromises conformation and/or binding epitopes for the Bin toxin (Darboux et al., 2007).

Table 2. Resistance of larvae from the *Culex pipiens* complex to *Bacillus sphaericus* in laboratory selected colonies (Lab), or field-treated populations.

Sample	Country	Origin	RR ^a	Bin-midgut interaction	Allele <i>r</i> ^b	Inheritance	References
GEO	USA	Lab	>100.000	No	<i>cpm1_{GEO}</i>	A/R	Wirth et al. (2001), Nielsen-LeRoux et al. (1995), Darboux et al. (2002)
R2362	Brazil	Lab	>100.000	No	<i>cqm1_{REC}</i> ^c	A/R	Pei et al. (2002), Romão et al. (2006)
RIAB59	Brazil	Lab	≅40.000	No	<i>cqm1_{REC}</i>	A/R	Pei et al. (2002), Amorim et al. (2007, 2010)
RLCq1/C3-41	China	Lab	>100.000	No	ND ^d	A/R	Pei et al. (2002), Oliveira et al. (2004)
Kochi	India	Field	≅150	ND	ND	ND	Rao et al. (1995)
Coque	Brazil	Field	≅10	Yes	ND	ND	Silva-Filha et al. (1995)
SPHAE	France	Field	>20.000	Yes	ND	R/S	Nielsen-LeRoux et al. (1997, 2002)
RFCq1	China	Field	>20.000	ND	ND	ND	Yuan et al. (2000)
TUNIS	Tunisia	Field	≅750	Yes	ND	R/S	Nielsen-LeRoux et al. (2002)
BP	France	Field	>5.000	No	<i>cpm1_{BP}</i> <i>cpm1_{BP-del}</i>	R/S	Darboux et al. (2007)
Wat Pikul	Thailand	Field	>125.000	ND	ND	ND	Mulla et al. (2003)

Note: A/R, autosomal recessive; R/S, recessive sex-linked.

^aResistance ratio at LC₉₀ (LC₉₀ for larvae from a test colony/LC₉₀ for larvae from a reference colony).

^bAllele which confers resistance.

^cThree alleles were found: *cqm1_{REC}*, *cqm1_{REC-16}* and *cqm1_{REC-25}*.

^dNot determined.

Data demonstrate that the *cqml* gene displays polymorphisms that prevent the expression of Cqml proteins able to function as the Bin toxin receptor. Five among the six polymorphisms described to date were found to be located in a hot spot of around 270 base pairs, a condition that facilitates the design of molecular monitoring tools (Chalegre et al., 2012). DNA-screening of three resistance alleles (*cqml*_{REC}, *cqml*_{REC-D16} and *cqml*_{RECD-25}) carried out in *Cx. quinquefasciatus* populations from Recife city showed that *cqml*_{REC} allele had the largest distribution, and, in the majority of the non-treated populations analysed, its frequency was in the order of 10^{-3} (Chalegre et al., 2009; Chalegre et al., 2012). Analysis of the biological cost associated to the *cqml*_{REC} allele in individuals from a resistant colony revealed a decrease in some biological parameters such as fecundity and developmental time and, although significant, differences were discrete (de Oliveira, Filho, Beltran, Silva-Filha, & Regis, 2003). Another study based on a colony established using an equal ratio of homozygous mosquitoes for susceptible (*cqml*) and resistant (*cqml*_{REC}) alleles demonstrated that *cqml*_{REC} frequency was stable throughout 10 generations in the absence of selection pressure, suggesting that *cqml*_{REC} could remain in populations after the interruption of treatments (Amorim et al., 2010). In view of the knowledge concerning Bin toxin resistance, it is highly recommended that mosquito control agencies adopt multiple strategies and the use of larvicides with different modes of action. Bti is one of the most suitable candidates to be used in association with *B. sphaericus* based on some features and, in particular, the lack of cross resistance among their toxins.

Bacillus thuringiensis serovar israelensis

Bacillus thuringiensis (Bt) has been classified into more than 80 serotypes, and their crystalline inclusions can display larvicidal activity in different insect orders Lepidoptera, Coleoptera and Diptera as well as some nematodes (de Maagd, Bravo, Berry, Crickmore, & Schnepf, 2003). The complete classification of Cry toxins is available at http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt. *B. thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti) is the most important dipteran-active serotype, and its development and utilisation took place soon after its discovery (Becker, 1997; Guillet et al., 1990; Margalit & Dean, 1985). Compared to *B. sphaericus*, Bti crystals have a broader spectrum of action, since it is active against not only Culicidae but also some species within the Simuliidae and Chironomidae (Goldberg & Margalit, 1978; Guillet et al., 1990; Lacey, 2007; Rodcharoen, Mulla, & Chaney, 1991). Its crystals contain three-domain type Cry toxins, and a cytolytic or Cyt toxin. Bti-based biolarvicides have been successfully used for simuliid and culicid larval control since 1980, and the *Ae. vexans* control programme that has been carried out in the Rhine River valley in Germany for more than 30 years is an example of sustainable use of this biolarvicide integrated with other measures (Becker, 1997; Guillet et al., 1990; Hougard & Seketeli, 1998; Regis, Silva-Filha, Nielsen-LeRoux, & Charles, 2001). Bti has also been an important tool for controlling *Simulium* in Brazil since 1982 (Mardini, Torres, da Silveira, & Atz, 2000), *Ae. vexans* in wetland areas from Switzerland since 1988 (Guidi, Patocchi, Luthy, & Tonolla, 2011), *Ae. rusticus* in some regions of France (Paris et al., 2010) and other programmes worldwide. Although it has a broader spectrum of action, Bti is more vulnerable to environmental factors compared to *B. sphaericus*, and suitable formulations and application strategies are

important factors to consider in order to achieve optimal field performance (Araújo, Melo-Santos, Carlos, Rios, & Regis, 2007; Melo-Santos, Araújo, Rios, & Regis, 2009).

Insecticidal toxins

Bti crystal toxins are coded by genes located in the pBtoxis megaplasmid (Berry et al., 2002). The most common protoxins found in these crystals are Cry4Aa (125 kDa), Cry4Ba (135 kDa), Cry11Aa (68 kDa) and Cyt1Aa (28 kDa). Some strains can also produce Cry10Aa (58 kDa) and Cyt2Ba (30 kDa) toxins that show activity against Diptera (Guerchicoff, Ugalde, & Rubinstein, 1997; Thorne et al., 1986). Both Cry and Cyt proteins are pore-forming toxins, a family of bacterial toxins that is able to insert itself in the cell membrane of their hosts (de Maagd et al., 2003). Despite the diversity among Cry toxins, sequence alignment showed five blocks of conserved amino acids suggesting that these regions are important for stability and protein function (Hofte & Whiteley, 1989). The Bti crystal has an intrinsic complexity, not comparable to any other larvicide available. Some attributes that make Bti unique are the number of protoxins available in the crystal, the dual composition of Cry and Cyt toxins, the optimal ratio of protoxins in crystals, the synergistic action among toxins, the role of Cyt as a surrogate receptor for the Cry's toxins and the diversity of insect midgut molecules which can act as receptors for the Cry toxins. The two families of Bti toxins possess different modes of action; the Cry toxins interact with receptors to attain the pre-pore oligomeric form, to insert in cell membranes and form pores, while the Cyt toxin has a cytolytic action and can interact directly with membranes (Soberón et al., 2007).

The structures of some Cry toxins, including the Cry4Aa and Cry4Ba from Bti, have been solved by X-ray crystallography, and they are characterised by three functional domains (Boonserm, Davis, Ellar, & Li, 2005; Derbyshire, Ellar, & Li, 2001; Grochulski et al., 1995; Li, Carroll, & Ellar, 1991; Li, Koni, & Ellar, 1996). Domain I (*N*-terminal) is composed of seven α -helices, domain II consists of three anti-parallel β sheets with exposed loop regions and domain III (*C*-terminal) is a β -sandwich of two anti-parallel β sheets. The function of these domains has been established, and Cry toxins interact with specific receptors on midgut epithelial cells preferentially through loops from domains II and III, while domain I is involved in membrane insertion, oligomerisation and pore formation (de Maagd et al., 2003; Pigott & Ellar, 2007). Cyt toxin has a single α - β domain and displays cytolytic activity, acting directly on cell membrane by pore formation, or through a detergent-like action (Bravo, Gill, & Soberón, 2007; Butko, 2003; Koni & Ellar, 1994). Crystals containing both Cry and Cyt toxins are mainly found in *B. thuringiensis* serotypes which are active for dipterans as Bti, as well as others like *Bacillus thuringiensis* serovar *jegathesan* (Seleena, Lee, & Lecadet, 1995) and *Bacillus thuringiensis* serovar *medellin* (Orduz, Rojas, Correa, Montoya, & de Barjac, 1992).

Toxins from Bti crystal act in synergy, and none of them, individually or in combination, has a larvicidal activity comparable to the native crystal (Crickmore, Bone, Williams, & Ellar, 1995; Poncet, Anello, Delécluse, Klier, & Rapoport, 1993). A previous work showed that the 50% lethal concentration (LC₅₀) of Bti crystals for *Ae. aegypti* larvae could be between 50- and 120-fold lower than the respective LCs of individual recombinant toxins, proving that synergistic interactions among them is a

requirement to achieve the high level of toxicity displayed by the crystal (Crickmore et al., 1995). The initial steps of Bti mode of action involve ingestion and solubilisation of crystals under alkaline midgut conditions, activation of protoxins into toxins, binding to receptors and pore forming at the cell membrane that results in a colloid–osmotic lysis (Bravo et al., 2007; Knowles & Ellar, 1987). Upon activation by proteolytic cleavage at *N*- and *C*-termini, Cry4Aa and Cry4Ba result in double fragments of 45 and 18 kDa; Cry11Aa yielded 32- and 34-kDa fragments, while Cyt1Aa shows a single 25-kDa fragment (de Barros Moreira Beltrão & Silva-Filha, 2007; Hofte & Whiteley, 1989). Early studies of the Bti mode of action have shown that each toxin has the ability to interact specifically to midgut microvilli, and they could share binding molecules (de Barros Moreira Beltrão & Silva-Filha, 2007; Ravoahangimalala & Charles, 1995).

Interactions with receptors

The molecular mode of action of Bt toxins has been better studied in lepidopteran larvae, due to its worldwide use in agriculture as a biolarvicide as well as in Bt-transgenic plants (Bravo, Likitvivatanavong, Gill, & Soberón, 2011). Molecules such as cadherins (CADRs), *N*-aminopeptidases (APNs), alkaline phosphatases (ALPs), glycoconjugates and some metalloproteases can act as receptors for Cry toxins (Jurat-Fuentes & Adang, 2004; Knight, Crickmore, & Ellar, 1994; Ochoa-Campuzano, Real, Martínez-Ramírez, Bravo, & Rausell, 2007; Vadlamudi, Weber, Ji, Ji, & Bulla, 1995; Valaitis, Jenkins, Lee, Dean, & Garner, 2001). The decrease or absence of Cry toxin receptors in insect midgut microvilli has been also implicated as an important mechanism of resistance, which reinforces the importance of toxin–receptor interaction in the mode of action (Ferré, Real, Van Rie, Jansens, & Peferoen, 1991; Ferré & Van Rie, 2002; Heckel et al., 2007). Some models have been proposed to explain the Cry toxin mode of action, although there is still controversy between the hypothesis that action is based on the toxin binding to receptors followed by pore formation, and that in which the toxins are able to activate intracellular signalling pathways that lead to cell death (Pigott & Ellar, 2007; Vachon, Laprade, & Schwartz, 2012). The Bravo model, based on the action of Cry1A in *Manduca sexta*, highlights the role of receptors and the sequential interaction of the toxin with two midgut receptors, for pore formation and subsequent cell lysis (Bravo et al., 2004). In this model, the toxins can bind to GPI-anchored receptors such as ALPs and APNs with relatively low affinity, but they also bind with higher affinity to CADRs. This latter binding promotes the cleavage of the α -helix 1 from the domain I inducing the oligomerisation, and this conformational change enable the oligomeric toxins to bind with high affinity to a second receptor, either APN's or ALP's proteins (Arenas, Bravo, Soberón, and Gómez 2010; Bravo et al., 2004). After this binding step, the toxin can insert itself in the membranes and provoke pore formation. The Zhang model does not support that cytotoxicity is well correlated with pore formation, but it proposes that Cry1A toxin binding to the cadherin BT-R1 from *M. sexta* triggers a signalling mechanism that activates a cell death pathway (Zhang, Candas, Griko, Taussig, & Bulla, 2006). It has also been assumed that both mechanisms, osmotic lysis and cell signalling, may take place simultaneously which has been suggested by studies of the Cry1Ac toxin action on the lepidopteran *Heliothis virescens* (Jurat-Fuentes & Adang, 2006).

Other pathways involved in the mode of action of Bt toxins have also been revealed. The mechanism of immune defence involving the MAPK p38 pathway, known to be activated in response to pore forming toxins, was found to have a role in the protection of *M. sexta* and *Ae. aegypti* larvae against the action of Cry toxins (Cancino-Rodezno et al., 2010). Mutations on ABC transporter genes were also found to be directly implied in the resistance of some lepidopteran species to Cry1Ab and Cry1Ac toxins, although the function of these molecules in resistance is still unknown (Atsumi et al., 2012; Gahan, Pauchet, Vogel, & Heckel, 2010). To date, there is still controversy concerning the pathways and molecules involved in the action of Bt toxins, and these have been analysed in recent reviews; however, there is a consensus that the midgut molecules identified as Cry toxin receptors, besides other recently identified, play an important role for the action of Bt toxin (Likitvivanavong et al., 2011; Pardo-Lopez, Soberon, and Bravo 2013; Pigott & Ellar, 2007; Vachon et al., 2012).

The mechanism of action of Bti toxins has been investigated, and CADR, GPI-anchored ALPs, GPI-anchored APNs and one α -amylase (AMY) were found to be receptors in mosquito larvae (Table 1). These proteins are mainly located in the same section of the midgut where the respective binding toxins were found to interact, in gastric caeca and posterior midgut, while APN's localisation seems to be restricted to the posterior midgut or, in some cases, only to the anterior midgut and gastric caeca (Likitvivanavong et al., 2011). Proteomic approaches have also identified other Bti Cry-binding molecules from *Ae. aegypti*, as flotilin, prohibitin, V-ATPase and actin, although the specific role of these in the mode of action has not been completely analysed (Bayyareddy, Andacht, Abdullah, & Adang, 2009; Popova-Butler & Dean, 2009).

CADRs constitute a large family of transmembrane glycoproteins responsible for intercellular adherence, although CADR which act as receptors of Cry toxins are different from other members from this family. The Cry-binding CADR are composed of a cytoplasmic domain, a transmembrane domain, a membrane-proximal extracellular domain and the ectodomain which is formed by the cadherin repeats (CRs) which are presented in the cell surface and then available for interaction with the toxins (Gómez et al., 2007). CADR were identified as receptors of Cry11Aa and Cry4Ba toxin in *Ae. aegypti* (Chen et al., 2009) and *An. gambiae* (Hua, Zhang, Abdullah, & Adang, 2008), respectively.

Alkaline phosphatases (ALPs) from the *Ae. aegypti* midgut were also characterised as receptors of Cry11Aa and Cry4Ba (Dechklar, Tiewisiri, Angsuthanasombat & Pootanakit, 2011; Fernández, Aimanova, Gill, Bravo, & Soberón, 2006; Fernández et al., 2005). Recent studies have shown that different isoforms of ALPs can play a role as receptors and Cry11Aa toxin bind them through two interaction sites located in domains II and III (Fernández et al., 2009) while only domain II from Cry4Ba was confirmed as responsible for this binding (Moonsom, Chaisri, Kasinrerak, & Angsuthanasombat, 2007). Gene silencing of the ALP1 isoform resulted in toxicity decrease of both Cry4Ba and Cry11Aa, but the higher impact on larval tolerance towards Cry11Aa suggests that ALP1 may be more important as its receptor (Jimenez et al., 2012). Besides the ALPs characterised as Cry toxin receptors, these molecules are well represented among mosquitoes and could be grouped in seven families, according to the criteria of diversity chosen (Likitvivanavong et al., 2011).

APNs play a primary role in protein digestion-cleaving amino acids from the *N*-terminus. An APN from the lepidopteran *Manduca sexta* was the first receptor identified for a *B. thuringiensis* Cry toxin (Knight et al., 1994). In the midgut of *Ae. aegypti* larvae, an APN was also shown to be receptor of Cry11Aa (Chen, Aimanova, Pan & Gill, 2009) and Cry4Ba toxins (Bayyareddy et al., 2009; Saengwiman et al., 2011). In the last study, three isoforms of APNs (APN2778, APN2783, APN5808) were identified by RNA interference assays as possible receptors. The APN2783 was the most promising since its silencing resulted in the highest level of Cry4Ba toxicity decrease observed. There is evidence that some isoforms of APNs can play a role in a greater or lesser degree in the Cry binding, suggesting that a complex of related molecules could be involved in this process. APNs from *Anopheles quadrimaculatus* and *An. gambiae* larvae were also characterised as the receptor for the Cry11Ba, a mosquitocidal toxin produced by *B. thuringiensis* serovar *jegathesan* (Abdullah, Valaitis, & Dean, 2006; Zhang, Hua, Andacht, & Adang, 2008). Some APNs display post-translational modification as *N*-glycosylations that can be essential for Cry toxin binding, as demonstrated in the interactions among Cry1A toxins and some APNs from lepidopteran species (Burton, Ellar, Li, & Derbyshire, 1999; Knight et al., 1994; Valaitis et al., 2001). On the other hand, binding of *Ae. aegypti* and *An. gambiae* APNs to Cry11Aa and Cry11Ba, respectively, did not seem to depend on the presence of glycans on these receptors (Chen, Aimanova, Pan et al., 2009; Zhang et al., 2008). The involvement of glycosylations in the GPI-anchored proteins for its role as receptors of bacterial toxins seems to be variable according to the model studied.

In addition to the categories of midgut molecules already described as receptors of Cry toxins in Lepidoptera and Diptera, an α -amylase (AMY) of 70 kDa (Amy1) from *Anopheles albimanus* midgut was identified as the receptor of Cry4Ba and Cry11Aa toxins (Fernandez-Luna et al., 2010). The family of α -amylases *sensu lato* also comprises the α -glucosidases from *Cx. pipiens* and *An. gambiae* which are receptors of the *B. sphaericus* Bin toxin (Opota et al., 2008; Romão et al., 2006; Silva-Filha, Nielsen-LeRoux, and Charles 1999).

Cyt1Aa is a strategic component of Bti crystal because it promotes synergy and enhances the action of Cry toxins (Perez et al., 2005). This toxin is able to directly insert in the cell membrane and can act as a receptor of Cry toxins by binding through specific epitopes mapped in these molecules. The first evidence showed that Cry11Aa can bind specifically to CytAa, and, subsequently, Cry11Aa binding to *Ae. aegypti* midgut microvilli was greatly enhanced by the previous insertion of Cyt1Aa in these cell membranes (Perez et al., 2005). Cry11Aa–Cyt1Aa interaction induced the formation of the pre-pore structure which is able to insert in membranes and form pores in cells, in a similar manner as the CADR receptors from Lepidoptera induces Cry1Aa oligomerisation (Bravo et al., 2007; Pérez et al., 2007). Mapping the regions involved in binding showed that Cry11Aa interacted through the loop α -8 from DII, the same region that it interacts with the APN. Recently it was shown that the Cry4Ba toxin is also able to bind to Cyt1Aa in the same regions involved in Cry11Aa binding (Cantón, Zanicthe Reyes, Ruiz de Escudero, Bravo, & Soberón, 2011). Data from these studies show that Cyt1Aa synergises Cry toxins by acting as receptor and promoting the oligomerisation needed for the pore formation which characterise the action of these toxins. The interaction with Cyt1Aa seems to amplify the binding of Cry toxins since it triggers oligomerisation and, under this state, Cry

could bind with higher affinity to a second receptor expressed in larvae midgut, such as APNs, ALPs and AMY already described. This could be the basis of the synergistic action of Bti toxins and the model of two receptors proposed for Cry toxins active to Lepidoptera (Bravo et al., 2004) could also be applied to Diptera. In this case, the Cyt1Aa can act as one of the receptors involved in the sequential binding of Bti Cry toxins.

The sequence of Bti toxins binding to the receptors that were already identified is still unknown. Based on the data available on the Cry1Aa toxin mode of action, a hypothesis concerning the dynamics of these events was raised. It has been proposed that monomeric forms of Cry toxins could bind to GPI-anchored ALPs and APNs with moderate affinity ($K_d \approx 100\text{--}200$ nM), but also with higher affinity ($K_d \approx 1$ nM) to cadherins in order form the pre-pore oligomer and to bind again to GPI-anchored receptors, with an increased affinity (Rodríguez-Almázan et al., 2012). As previously described, the Cyt1Aa could act as a surrogate receptor playing a similar role as the CADR. Nevertheless, evidence has indicated that Bti mode of action on mosquito is likely to display some differences compared to the Cry1A model in Lepidoptera. For an instance, Cry11Ba toxin from *B. thuringiensis* serovar *jegathesan* was able to bind with high affinity to APNs from *An. gambiae* and *An. quadrimaculatus*, contrasting with lower toxin affinity seen for Lepidoptera APNs. Data suggest that toxin could bind with high affinity with these GPI-anchored receptors without the need of a previous step to improve its capacity of interaction (Likitvivanavong et al., 2011). Furthermore, the activated form of Cry4Ba toxin is able to form oligomers in vitro, in the absence of the CADR, contrarily to Cry11Aa toxin whose binding to the CR7-11 of this receptor is necessary to promote oligomerisation (Rodríguez-Almázan et al., 2012).

Overall, the Bti mode of action is still under investigation, and data available already revealed that a complex set of events takes place to achieve full toxicity in larvae, and these conditions do not favour the selection of resistance, as being observed amongst Bti-treated populations worldwide (Wirth, 2010).

Investigation of resistance

Although resistance to Bt toxins has been reported for lepidopteran species (Ferré et al., 1991; Gahan, Gould, & Heckel, 2001; Jurat-Fuentes & Adang, 2004; Morin et al., 2003; Tabashnik et al., 2006; Xu, Yu, & Wu, 2005; Zhang et al., 2009), there are no reports of resistance to Bti-based biolarvicides since their introduction in control programmes in 1982 (Becker, 1997; Guidi et al., 2011; Guillet et al., 1990). The susceptibility levels of mosquito populations to Bti have been screened, and these can be useful as a baseline data of variations occurring in populations, before the introduction of this biolarvicide (Table 3). Evaluation of around 50 populations of *Culex pipiens* without history of Bti exposure has shown variations of resistance ratios (RRs) ranging from less than 3- to 12.5-fold (Vasquez, Violaris, Hadjivassilis, & Wirth, 2009; Wirth, Ferrari, & Georghiou, 2001). Non-treated populations of *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* and *Ae. rusticus*, from different origins, displayed variation in RR values that were 1.1–2.8, 1.06–3.9, 1.5–2.8, respectively (Aziz et al., 2011; Boyer, Paris, Jégo, Lemperiere, & Ravanel, 2012; Kamgang et al., 2011; Lee & Zairi, 2006). Data from these surveys indicated variations in the susceptibility of populations to Bti and this parameter should be taken into account in evaluating the status of a

Table 3. Susceptibility of mosquito field populations to *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*.

Species	Country	Populations	Status	RR ^a	References
<i>Culex pipiens</i>	Cyprus	7	NT	12.5	Wirth et al. (2001)
	Cyprus	10	NT	<3	Vasquez et al. (2009)
	USA	31	NT	4.0	Wirth et al. (2001)
	USA	2	T	6–33	Paul et al. (2005)
	USA	3	T	0.7–1.0	Liu et al. (2004a)
<i>Aedes aegypti</i>	Malaysia	4	NT	1.4–2.0	Lee and Zahiri (2006)
	Cameroon	4	NT	1.1–2.8	Kamgang et al. (2011)
	Saudi Arabia	1	NT	1.25	Aziz et al. (2011)
<i>Aedes albopictus</i>	Malaysia	2	T	2–4	Loke et al. (2010)
	Cameroon	3	NT	1.06–1.13	Kamgang et al. (2011)
	Malaysia	4	NT	1.2–3.9	Lee and Zahiri (2006)
<i>Aedes vexans</i>	USA	2	T	≈1	Liu et al. (2004b)
	Germany	3	T	≈1	Becker and Ludwig (1993)
<i>Aedes rusticus</i>	France	3	NT	1.5–2.8	Boyer et al. (2012)
	France	4	T	2.3–4.2	Boyer et al. (2012)
<i>Anopheles sinensis</i>	China	5	ND	1.7–5.9	Hongyu et al. (2004)

Note: NT, non-treated population; T, treated populations; ND, not determined.

^aResistance ratio at LC₉₀ or LC₉₅ (LC for a test colony/LC for a reference colony).

given population. Among the treated populations, variations in the RR, compared to laboratory reference or non-treated colonies, were quite similar to those observed in non-treated samples (Becker & Ludwig, 1993; Hongyu, Changju, Jingye, & Lin, 2004; Liu, Cupp, Guo, & Liu, 2004; Liu, Cupp, Micher, Guo, & Liu, 2004; Loke, Andy-Tan, Benjamin, Lee, & Sofian-Azirun, 2010). The report of two *C. pipiens* populations from New York State which had a history of Bti spraying and displayed RR at LC₉₅ of 14- and 41-fold was found to be an exception in this scenario (Paul, Harrington, Zhang, & Scott, 2005). It is likely that the analysis of a single observation, without data from the pre-treatment period or, alternatively, from other non-treated populations in the same area, could be insufficient to demonstrate that the differences detected were a consequence of Bti treatments.

Artificial selection under laboratory conditions using whole Bti crystals failed to show significant alterations, and attempts described in the literature showed a maximum RR of around three-fold (Table 4) (Georghiou & Wirth, 1997; Goldman, Arnold, & Carlton, 1986; Mittal, 2005; Paris et al., 2011; Saleh, El-Meniawi, Kelada, & Zahran, 2003). This level does not seem to be biologically meaningful, considering the variations of susceptibility that can be found prior to the introduction of these biolarvicides (Table 3). On the other hand, resistance can arise in colonies under selection using single toxins or combination of Bti toxins, due to loss of synergy among the components from native crystals (Cadavid-Restrepo, Sahaza, & Orduz, 2012; Georghiou & Wirth, 1997; Paris, David, & Després, 2011; Paris et al., 2011; Wirth, 2010; Wirth, Walton, & Federici, 2012). In the same manner, when colonies are subjected to whole Bti, resistance does not arise to this component, but alterations of susceptibility to single toxins can be observed as a result of the

Table 4. Selection of Culicine larvae with *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* under laboratory conditions.

Species	Origin	No. of generations	RR ^a at LC ₅₀	References
<i>Culex pipiens</i>	USA (CA)	28	2.0	Georghiou and Wirth (1997)
	India	20	2–3	Mittal (2005)
	Egypt	20	2.8	Saleh et al. (2003)
<i>Aedes aegypti</i>	Georgia	15	1.1	Goldman et al. (1986)
	Sri Lanka	15	1.1	Goldman et al. (1986)
	Brazil	15	2.0	Goldman et al. (1986)
	France	18	2.0	Paris et al. (2011)

^aResistance ratio at LC₅₀ (LC for a test colony/LC for a reference colony).

selection pressure imposed. Analysis of an *Ae. aegypti* colony selected with Bti which displayed RR to single toxins (68-, 9- and 9-fold for Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11Aa, respectively) has shown that ALPs, APNs and V-ATPase genes were under expressed compared to a reference colony (Tetreau et al., 2012). Once these molecules have been characterised as binding sites of Cry toxins, it is likely that they could be involved in mechanisms responsible for the reduction of susceptibility for individual toxins found in this laboratory colony. Although there is a low potential for Bti selection of resistance, possible mechanisms of resistance related to the alterations of receptors or proteolytic processing, innate immune response and other pathways, should be continually investigated to provide knowledge on its mode of action (Bravo et al., 2011). Recent studies investigated defence mechanisms of *Ae. aegypti* which are induced by the exposure to Bti toxins. Proteins from the unfold protein response (UPR) pathway as well as others from different cell functions, as energy production and cytoskeleton maintenance, were found to be involved in the cell response to the action of Cry11Aa (Bedoya-Perez, Cancino-Rodezno, Flores-Escobar, Soberón, & Bravo, 2013; Cancino-Rodezno et al., 2012).

The low potential for Bti resistance, as discussed in the previous section, is the result of multiple factors and, in particular, due to synergy promoted by Cyt1Aa being a receptor for Cry toxins that, *per se*, could overcome failures related to midgut receptors. Regardless of the participation of other molecules for the Bti mode of action, the interaction of Cry toxin with these receptors remains crucial.

Resistance management

Dipteran species have been specially affected by resistance that has spread at a worldwide scale (Hemingway, Hawkes, McCarroll, & Ranson, 2004). Limitations related to the use of chemical insecticides, mainly insect resistance and the effects of conventional insecticides on non-target organisms, have raised a new paradigm of integrated mosquito management, aiming to achieve the reduction of populations through the association of effective and environmentally safe methods. In this way biolarvicides can be useful tools, but resistance has to be continuously surveyed since insects have a high capacity to adapt, and the selection of resistance could also be an obstacle to their use. In the case of *B. sphaericus* and Bti, the potential of resistance selection is distinct because of their profile of insecticidal crystals, as well as how these toxins interact with their target sites in the midgut. *B. sphaericus* display a

mode of action based on one toxin which targets a single class of receptor, and the selection of resistance can take place if this agent is continuously used. To exploit the beneficial features of *B. sphaericus* for mosquito control and avoid the continuous selection pressure of exposed mosquito populations, the use of larvicides with different modes of action in schemes of rotation or association is necessary. The adoption of combined strategies can provide effectiveness on a long-term basis. Bti is strongly recommended for this purpose since its toxins act on multiple and distinct receptors from those binding sites of the Bin toxin, and numerous studies have demonstrated the lack of cross-resistance to *B. sphaericus* (Amorim et al., 2007; Nielsen-Leroux, Charles, Thiery, & Georghiou, 1995; Pei et al., 2002; Yuan, Pei, Regis, Nielsen-Leroux, & Cai, 2003). The Cyt1Aa toxin from Bti is able to synergise the Bin toxin and overcome Bin resistance in mosquito larvae, although the molecular mechanism underlying this interaction has not yet been elucidated (Wirth, Federici, & Walton, 2000; Wirth, Jiannino, Federici, & Walton, 2004; Wirth, Park, Walton, & Federici, 2005; Wirth, Walton, & Federici, 2000; Wirth et al., 2007). Approaches to obtain recombinant bacteria able to produce a set of *B. sphaericus* and Bti toxins have also been investigated, and, although the results were promising, commercial products based on this technology are not yet available (Federici, Park, & Bideshi, 2010; Federici et al., 2007; Park et al., 2005). On the other hand, products based on the combined composition of *B. sphaericus* and Bti native crystals have been developed, and field trials have demonstrated their effectiveness in controlling culicid species in different habitats, with the advantage of preventing resistance selection because of the multiple toxins available in these products (Anderson et al., 2011; Dritz et al., 2011).

Other toxins produced by some *B. sphaericus* strains, such as Mtx's and Cry48Aa/Cry49Aa which are not related to the Bin toxin, are also a source for the development of new compounds. These toxins are likely to act in different sites from Bin toxins, and they can be employed to overcome resistance in *Cx. pipiens* (de Melo et al., 2009; Wirth et al., 2007). *B. thuringiensis* serovar *jegathesan* and *B. thuringiensis* serovar *medellin* produce known mosquitocidal toxins which remain to be exploited, besides new strains under investigation. Recently a *B. thuringiensis* mosquitocidal strain whose crystals display activity to *Cx. quinquefasciatus* and *Ae. albopictus* comparable to Bti has been identified (Zhang et al., 2012). Molecular analysis showed a profile of *cry* genes and crystal proteins potentially different from other related mosquitocidal strains, including Bti.

Concluding remarks

Biolarvicides based on entomopathogenic bacteria have been useful tools for mosquito control in view of their effectiveness and safety for non-target organisms. Bin toxin from *B. sphaericus* insecticidal strains is highly effective for culicid larvae and shows long persistence under field conditions; however, its mode of action, based on the interaction of a toxin with a single class of receptors in the gut epithelium of larvae requires monitoring and strategies for the management of resistance. Bti, on the other hand, has a mechanism of action based on multiple interactions of four insecticidal toxins with a set of membrane-bound molecules from the mosquito midgut and the particular action of Cyt1Aa toxin. Moreover, Bti can play a strategic role for the management of resistance to *B. sphaericus* and other insecticides because

of the singularity of its mode of action and low potential cross-resistance with other compounds. The nature of the interaction between bacterial toxins and their target receptors in Diptera insects is the most critical step in their mode of action, and this feature has given to these biolarvicides the status of the most selective and environmentally safe method of vector control. The use of insecticides with different modes of action in the scope of integrated control programmes is essential to overcome insecticide resistance. The availability of a new generation of biolarvicides containing multiple insecticidal factors will be an advance for vector control in terms of improved efficacy, selective spectrum and low risk for resistance selection.

Acknowledgements

We thank Henry R. Rupp, MA, for kindly reviewing this manuscript, Dr. Cláudia Maria Fontes de Oliveira, Dr. Sinval Brandão Filho and Dr. Zulma Medeiros for supporting its preparation. This work was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FACEPE (APQ 0427-2.13/08), Conselho Nacional de Pesquisa-CNPq (472491/2012-1) and Fundação Osvaldo Cruz-FIOCRUZ.

References

- 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 Biochemistry*, 7, 16. doi:10.1186/1471-2091-7-16
- Alexander, B., & Priest, F. G. (1990). Numerical classification and identification of *Bacillus sphaericus* including some strains pathogenic for mosquito larvae. *Journal of General Microbiology*, 136, 367–376. doi:10.1099/00221287-136-2-367
- Amorim, L. B., de Barros, R. A., de Melo Chalegre, K. D., de Oliveira, C. M. F., Narcisa Regis, L., & Silva-Filha, M. H. N. L. (2010). Stability of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* evaluated by molecular tools. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 311–316. doi:10.1016/j.ibmb.2010.02.002
- Amorim, L. B., Oliveira, C. M. F., Rios, E. M., Regis, L., & Silva-Filha, M. H. N. L. (2007). Development of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* strain IAB59 needs long term selection pressure. *Biological Control*, 42, 155–160. doi:10.1016/j.biocontrol.2007.04.007
- Anderson, J. F., Ferrandino, F. J., Dingman, D. W., Main, A. J., Andreadis, T. G., & Becnel, J. J. (2011). Control of mosquitoes in catch basins in Connecticut with *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Bacillus sphaericus*, [corrected] and spinosad. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 27, 45–55. doi:10.2987/10-6079.1
- Araújo, A. P., de Melo-Santos, M. A. V., Carlos, S. O., Rios, E. M. M. M., & Regis, L. (2007). Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). *Biological Control*, 41, 339–347. doi:10.1016/j.biocontrol.2007.03.002
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 12497–12503. doi:10.1074/jbc.M109.085266
- Atsumi, S., Miyamoto, K., Yamamoto, K., Narukawa, J., Kawai, S., Sezutsu, H., . . . Noda, H. (2012). Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109, E1591–E1598. doi:10.1073/pnas.1120698109
- Aziz, A. T., Dieng, H., Hassan, A. A., Satho, T., Miake, F., Salmah, M. R. C., & AbuBakar, S. (2011). Insecticide susceptibility of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Makkah City, Saudi Arabia. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 1, 94–99. doi:10.1016/S2222-1808(11)60044-3

- Barbazan, P., Baldet, T., Darriet, F., Escaffre, H., Djoda, D. H., & Hougard, J. M. (1997). Control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) with *Bacillus sphaericus* in Maroua, Cameroon. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 13, 263–269. Retrieved from http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_6/b_fdi_47-48/010012154.pdf
- Baumann, P., Unterman, B. M., Baumann, L., Broadwell, A. H., Abbene, S. J., & Bowditch, R. D. (1985). Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. *Journal of Bacteriology*, 163, 738–747. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC219184/pdf/jbacter00219-0338.pdf>
- 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 Biochemistry and Molecular Biology*, 39, 279–286. doi:10.1016/j.ibmb.2009.01.002
- Becker, N. (1997). Microbial control of mosquitoes: Management of the upper Rhine mosquito population as a model programme. *Parasitology Today*, 13, 485–487. doi:10.1016/S0169-4758(97)01154-X
- Becker, N., & Ludwig, M. (1993). Investigation on possible resistance in *Aedes vexans* field populations after 10-year application of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 9, 221–224.
- Bedoya-Perez, L. P., Cancino-Rodezno, A., Flores-Escobar, B., Soberón, M., & Bravo, A. (2013). Role of UPR pathway in defense response of *Aedes aegypti* against Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 8467–8478. doi:10.3390/ijms14048467
- Berry, C., Hindley, J., Ehrhardt, A. F., Grounds, T., de Souza, I., & Davidson, E. W. (1993). Genetic determinants of host ranges of *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal toxins. *Journal of Bacteriology*, 175, 510–518. Retrieved from <http://jb.asm.org/content/175/2/510.long>
- Berry, C., O’Neil, S., Ben-Dov, E., Jones, A. F., Murphy, L., Quail, M. A., ... Parkhill, J. (2002). Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5082–5095. doi:10.1128/AEM.68.10.5082-5095.2002
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D. J., & Li, J. (2005). Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *Journal of Molecular Biology*, 348, 363–382. doi:10.1016/j.jmb.2005.02.013
- Boonserm, P., Moonsom, S., Boonchoy, C., Promdonkoy, B., Parthasarathy, K., & Torres, J. (2006). Association of the components of the binary toxin from *Bacillus sphaericus* in solution and with model lipid bilayers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342, 1273–1278. doi:10.1016/j.bbrc.2006.02.086
- Boyer, S., Paris, M., Jego, S., Lemperiere, G., & Ravanel, P. (2012). Influence of insecticide *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* treatments on resistance and enzyme activities in *Aedes rusticus* larvae (Diptera: Culicidae). *Biological Control*, 62, 75–81. doi:10.1016/j.biocontrol.2012.02.001
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49, 423–435. doi:10.1016/j.toxicon.2006.11.022
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., ... Soberón, M. (2004). Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1667, 38–46. doi:10.1016/j.bbamem.2004.08.013
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41, 423–431. doi:10.1016/j.ibmb.2011.02.006
- Broadwell, A. H., & Baumann, P. (1987). Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 1333–1337. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC203865/pdf/aem00123-0137.pdf>

- Broadwell, A. H., Clark, M. A., Baumann, L., & Baumann, P. (1990). Construction by site-directed mutagenesis of a 39-kilodalton mosquitocidal protein similar to the larva-processed toxin of *Bacillus sphaericus* 2362. *Journal of Bacteriology*, 172, 4032–4036. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC213389/pdf/jbacter00121-0508.pdf>
- 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. *Journal of Molecular Biology*, 287, 1011–1022. doi:10.1006/jmbi.1999.2649
- Butko, P. (2003). Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: Data and hypotheses. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2415–2422. doi:10.1128/AEM.69.5.2415-2422.2003
- Cadavid-Restrepo, G., Sahaza, J., & Orduz, S. (2012). Treatment of an *Aedes aegypti* colony with the Cry11Aa toxin for 54 generations results in the development of resistance. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107, 74–79. doi:10.1590/S0074-02762012000900013
- Cancino-Rodezno, A., Alexander, C., Villasenor, R., Pacheco, S., Porta, H., Pauchet, Y., ... Bravo, A. (2010). The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 58–63. doi:10.1016/j.ibmb.2009.12.010
- Cancino-Rodezno, A., Lozano, L., Oppert, C., Castro, J. I., Lanz-Mendoza, H., Encarnación, S., ... Bravo, A. (2012). Comparative proteomic analysis of *Aedes aegypti* larval midgut after intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS One*, 7, e37034. doi:10.1371/journal.pone.0037034.t003
- Cantón, P. E., Zanicthe Reyes, E. Z., Ruiz de Escudero, I., Bravo, A., & Soberón, M. (2011). Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. *Peptides*, 32, 595–600. doi:10.1016/j.peptides.2010.06.005
- Chalegre, K. D., Romão, T. P., Amorim, L. B., Anastacio, D. B., de Barros, R. A., de Oliveira, C. M. F., ... Silva-Filha, M. H. N. L. (2009). Detection of an allele conferring resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex quinquefasciatus* populations by molecular screening. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 1044–1049. doi:10.1128/AEM.02032-08
- Chalegre, K. D., Romão, T. P., Tavares, D. A., Santos, E. M., Ferreira, L. M., Oliveira, C. M. F., ... Silva-Filha, M. H. N. L. (2012). Novel mutations associated to *Bacillus sphaericus* resistance are identified in a polymorphic region of the *Culex quinquefasciatus* *cqml* gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 6321–6326. doi:10.1128/AEM.01199-12
- Charles, J.-F. (1987). Ultrastructural midgut events in Culicidae larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spore/crystal complex. *Annales de l'Institut Pasteur Microbiologie*, 138, 471–484. doi:10.1016/0769-2609(87)90064-0
- Charles, J. F., & de Barjac, H. (1983). Action of crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on the midgut of *Aedes aegypti* L. larvae, studied by electron microscopy. *Annales de Microbiologie (Paris)*, 134A, 197–218.
- Charles, J.-F., Nielsen-LeRoux, C., & Delecluse, A. (1996). *Bacillus sphaericus* toxins: Molecular biology and mode of action. *Annual Review of Entomology*, 41, 451–472. doi:10.1146/annurev.en.41.010196.002315
- Charles, J. F., Silva-Filha, M. H., Nielsen-LeRoux, C., Humphreys, M. J., & Berry, C. (1997). Binding of the 51- and 42-kDa individual components from the *Bacillus sphaericus* crystal toxin to mosquito larval midgut membranes from *Culex* and *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae). *FEMS Microbiology Letters*, 156, 153–159. doi:10.1016/S0378-1097(97)00419-9
- Chen, J., Aimanova, K. G., Fernandez, L. E., Bravo, A., Soberon, M., & Gill, S. S. (2009). *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biochemistry Journal*, 424, 191–200. doi:10.1042/BJ20090730
- Chen, J., Aimanova, K. G., Pan, S., & Gill, S. S. (2009). Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39, 688–696. doi:10.1016/j.ibmb.2009.08.003
- Crickmore, N., Bone, E. J., Williams, J. A., & Ellar, D. J. (1995). Contribution of the individual components of the delta-endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 131, 249–254. doi:10.1111/j.1574-6968.1995.tb07784.x

- Darboux, I., Charles, J.-F., Pauchet, Y., Warot, S., & Pauron, D. (2007). Transposon-mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Cellular Microbiology*, 9, 2022–2029. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00934.x
- Darboux, I., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.-F., & Pauron, D. (2001). The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31, 981–990. doi:10.1016/S0965-1748(01)00046-7
- Darboux, I., Pauchet, Y., Castella, C., Silva-Filha, M. H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J. F., & Pauron, D. (2002). Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99, 5830–5835. doi:10.1073/pnas.092615399
- Davidson, E.W. (1988). Binding of the *Bacillus sphaericus* (Eubacteriales: Bacillaceae) toxin to midgut cells of mosquito (Diptera: Culicidae) larvae: Relationship to host range. *Journal of Medical Entomology*, 25, 151–157.
- Davidson, E. W. (1989). Variation in binding of *Bacillus sphaericus* toxin and wheat germ agglutinin to larval midgut cells of six species of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 53, 251–259. doi:10.1016/0022-2011(89)90015-3
- de Barjac, H. (1978). A new variety of *Bacillus thuringiensis* very toxic to mosquitoes: *B. thuringiensis* var. *israelensis* serotype 14. *Comptes Rendus des Seances Hebdomadaires de l'Academie des Sciences Serie D*, 286, 797–800.
- de Barros Moreira Beltrão, H., & Silva-Filha, M. H. N. L. (2007). Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. *FEMS Microbiology Letters*, 266, 163–169. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00527.x
- 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. *Annual Review of Genetics*, 37, 409–433. doi:10.1146/annurev.genet.37.110801.143042
- de Melo, J. V., Jones, G. W., Berry, C., Vasconcelos, R. H. T., de Oliveira, C. M. F., Furtado, A. F., ... Silva-Filha, M. H. N. L. (2009). Cytopathological effects of *Bacillus sphaericus* Cry48Aa/Cry49Aa toxin on binary toxin-susceptible and -resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 4782–4789. doi:10.1128/AEM.00811-09
- de Melo, J. V., Vasconcelos, R. H. T., Furtado, A. F., Peixoto, C. A., & Silva-Filha, M. H. N. L. (2008). Ultrastructural analysis of midgut cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*. *Micron*, 39, 1342–1350. doi:10.1016/j.micron.2008.02.002
- de Oliveira, C. M., Filho, F. C., Beltran, J. E., Silva-Filha, M. H., & Regis, L. (2003). Biological fitness of a *Culex quinquefasciatus* population and its resistance to *Bacillus sphaericus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 19, 125–129.
- Dechklar, M., Tiewisiri, K., Angsuthanasombat, C., & Pootanakit, K. (2011). Functional expression in insect cells of glycosylphosphatidylinositol-linked alkaline phosphatase from *Aedes aegypti* larval midgut: A *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41, 159–166. doi:10.1016/j.ibmb.2010.11.006
- Derbyshire, D. J., Ellar, D. J., & Li, J. (2001). Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin CryIAc and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 57, 1938–1944. doi:10.1107/S090744490101040X
- Dritz, D. A., Lawler, S. P., Evkhanian, C., Graham, P., Baracosa, V., & Dula, G. (2011). Control of mosquito larvae in seasonal wetlands on a wildlife refuge using VectoMax CG. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 27, 398–403. doi:10.2987/11-6161.1
- Elangovan, G., Shanmugavelu, M., Rajamohan, F., Dean, D. H., & Jayaraman, K. (2000). Identification of the functional site in the mosquito larvicidal binary toxin of *Bacillus sphaericus* 1593M by site-directed mutagenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276, 1048–1055. doi:10.1006/bbrc.2000.3575
- Federici, B. A., Park, H. D., & Bideshi, D. K. (2010). Overview of the basic biology of *Bacillus thuringiensis* with emphasis on genetic engineering of bacterial larvicides for mosquito control. *The Open Toxinology Journal*, 3, 83–100. doi:10.2174/1875414701003010083

- Federici, B. A., Park, H.-W., Bideshi, D. K., Wirth, M. C., Johnson, J. J., Sakano, Y., & Tang, M. (2007). Developing recombinant bacteria for control of mosquito larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23, 164–175. doi:10.2987/8756-971X(2007)23 [164:DRBFCO]2.0.CO;2
- 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. *Biochemical Journal*, 394, 77–84. doi:10.1042/BJ20051517
- Fernández, L. E., Martínez-Anaya, C., Lira, E., Chen, J., Evans, A., Hernández-Martínez, S., ... Soberón, M. (2009). Cloning and epitope mapping of Cry11Aa-binding sites in the Cry11Aa-receptor alkaline phosphatase from *Aedes aegypti*. *Biochemistry*, 48, 8899–8907. doi:10.1021/bi900979b
- Fernández, L. E., Pérez, C., Segovia, L., Rodríguez, M. H., Gill, S. S., Bravo, A., & Soberón, M. (2005). Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop alpha-8 of domain II. *FEBS Letters*, 579, 3508–3514. doi:10.1016/j.febslet.2005.05.032
- Fernandez-Luna, M. T., Lanz-Mendoza, H., Gill, S. S., Bravo, A., Soberon, M., & Miranda-Rios, J. (2010). An alpha-amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Environmental Microbiology*, 12, 746–757. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02117.x
- Ferré, J., Real, M. D., Van Rie, J., Jansens, S., & Peferoen, M. (1991). Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88, 5119–5123. doi:10.1073/pnas.88.12.5119
- Ferré, J., & Van Rie, J. (2002). Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 47, 501–533. doi:10.1146/annurev.ento.47.091201.145234
- Ferreira, L. M., Romão, T. P., de-Melo-Neto, O. P., & Silva-Filha, M. H. N. L. (2010). The orthologue to the Cpml/Cqml receptor in *Aedes aegypti* is expressed as a midgut GPI-anchored alpha-glucosidase, which does not bind to the insecticidal binary toxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 604–610. doi:10.1016/j.ibmb.2010.05.007
- Gahan, L. J., Gould, F., & Heckel, D. G. (2001). Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, 293, 857–860. doi:10.1126/science.1060949
- Gahan, L. J., Pauchet, Y., Vogel, H., & Heckel, D. G. (2010). An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *PLoS Genetics*, 6, e1001248. doi:10.1371/journal.pgen.1001248.s006
- Georghiou, G. P., & Wirth, M. C. (1997). Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1095–1101. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1389136/pdf/hw1095.pdf>
- Goldberg, L. H., & Margalit, J. (1978). A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles segentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito News*, 37, 355–358.
- Goldman, I. F., Arnold, J., & Carlton, B. C. (1986). Selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* in field and laboratory populations of the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 47, 317–324. doi:10.1016/0022-2011(86)90102-3
- Gómez, I., Pardo-López, L., Muñoz-Garay, C., Fernandez, L. E., Pérez, C., Sánchez, J., ... Bravo, A. (2007). Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, 28, 169–173. doi:10.1016/j.peptides.2006.06.013
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.-L., Brousseau, R., & Cyler, M. (1995). *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: Crystal structure and channel formation. *Journal of Molecular Biology*, 254, 447–464. doi:10.1006/jmbi.1995.0630
- Guerchicoff, A., Ugalde, R. A., & Rubinstein, C. P. (1997). Identification and characterization of a previously undescribed cyt gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2716–2721. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168567/pdf/632716.pdf>

- Guidi, V., Patocchi, N., Luthy, P., & Tonolla, M. (2011). Distribution of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in soil of a Swiss wetland reserve after 22 years of mosquito control. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 3663–3668. doi:10.1128/AEM.00132-11
- Guillet, P., Kurtak, D. C., Phillipon, B., & Meyer, R. (1990). Use of *Bacillus thuringiensis* for onchocerciasis control in West Africa. In: H. Barjac & D. Sutherland (Eds.), *Bacterial control of mosquitoes and black-flies* (pp. 187–201). New Brunswick, NJ: Rutgers University Press.
- Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J., ... Peeling, R. W. (2010). Dengue: A continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*, 8, S7–S16. doi:10.1038/nrmicro2460
- Heckel, D. G., Gahan, L. J., Baxter, S. W., Zhao, J.-Z., Shelton, A. M., Gould, F., & Tabashnik, B. E. (2007). The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95, 192–197. doi:10.1016/j.jip.2007.03.008
- Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L., & Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34, 653–665. doi:10.1016/j.ibmb.2004.03.018
- Hire, R. S., Hadapad, A. B., Dongre, T. K., & Kumar, V. (2009). Purification and characterization of mosquitocidal *Bacillus sphaericus* BinA protein. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101, 106–111. doi:10.1016/j.jip.2009.03.005
- Hofte, H., & Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology Review*, 53, 242–255. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372730/pdf/microrev00041-0080.pdf>
- Hongyu, Z., Changju, Y., Jingye, H., & Lin, L. (2004). Susceptibility of field populations of *Anopheles sinensis* (Diptera:Culicidae) to *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis*. *Biocontrol Science and Technology*, 14, 321–325. doi:10.1080/09583150310001639187
- Hougaard, J. M., & Seketeli, A. (1998). Combating onchocerciasis in Africa after 2002: The place of vector control. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 92, S165–S166. Retrieved from http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_6/b_fdi_49-50/010013696.pdf
- Hua, G., Zhang, R., Abdullah, M. A. F., & 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. doi:10.1021/bi7023578
- Humphreys, M. J., & Berry, C. (1998). Variants of the *Bacillus sphaericus* binary toxins: Implications for differential toxicity of strains. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71, 184–185. doi:10.1006/jipa.1997.4711
- Jimenez, A. I., Reyes, E. Z., Cancino-Rodezno, A., Bedoya-Pérez, L. P., Caballero-Flores, G. G., Muriel-Millan, L. F., ... Soberón, M. (2012). *Aedes aegypti* alkaline phosphatase ALP1 is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42, 683–689. doi:10.1016/j.ibmb.2012.06.001
- Jones, G. W., Nielsen-Leroux, C., Yang, Y., Yuan, Z., Dumas, V. F., Monnerat, R. G., & Berry, C. (2007). A new Cry toxin with a unique two-component dependency from *Bacillus sphaericus*. *The FASEB Journal*, 21, 4112–4120. doi:10.1096/fj.07-8913com
- Jones, G. W., Wirth, M. C., Monnerat, R. G., & Berry, C. (2008). The Cry48Aa-Cry49Aa binary toxin from *Bacillus sphaericus* exhibits highly restricted target specificity. *Environmental Microbiology*, 10, 2418–2424. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01667.x
- Jurat-Fuentes, J. L., & Adang, M. J. (2004). Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *European Journal of Biochemistry*, 271, 3127–3135. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04238.x
- Jurat-Fuentes, J. L., & Adang, M. J. (2006). Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92, 166–171. doi:10.1016/j.jip.2006.01.010
- Kamgang, B., Marcombe, S., Chandre, F., Nchoutpouen, E., Nwane, P., Etang, J., ... Paupy, C. (2011). Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. *Parasite & Vectors*, 4, 79. doi:10.1186/1756-3305-4-60
- Karch, S., & Charles, J.-F. (1987). Toxicity, viability and ultrastructure of *Bacillus sphaericus* 2362 spore/crystal complex used in the field. *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie*, 138, 485–492. doi:10.1016/0769-2609(87)90065-2

- Kellen, W. R., Clark, T. B., Lindegren, J. E., Ho, B. C., Rogoff, M. H., & Singer, S. (1965). *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 7, 442–448. doi:10.1016/0022-2011(65)90120-5
- Knight, P. J. K., Crickmore, N., & Ellar, D. J. (1994). The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Molecular Microbiology*, 11, 429–436. doi:10.1111/j.1365-2958.1994.tb00324.x
- Knowles, B. H., & Ellar, D. J. (1987). Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 924, 509–518. doi:10.1016/0304-4165(87)90167-X
- Koni, P. A., & Ellar, D. J. (1994). Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxins. *Microbiology*, 140, 1869–1880. doi:10.1099/13500872-140-8-1869
- Krasikov, V. V., Karellov, D. V., & Firsov, L. M. (2001). Alpha-glucosidases. *Biochemistry (Moscow)*, 66, 267–281. doi:10.1023/A:1010243611814
- Kumar, A., Sharma, V. P., Sumodan, P. K., Thavaselvam, D., & Kamat, R. H. (1994). Malaria control utilizing *Bacillus sphaericus* against *Anopheles stephensi* in Panaji, Goa. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 10, 534–539.
- Kyle, J. L., & Harris, E. (2008). Global spread and persistence of dengue. *Annual Review of Microbiology*, 62, 71–92. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.163005
- Lacey, L. A. (2007). *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23, 133–163. doi:10.2987/8756-971X(2007)23[133:BTSIABJ]2.0.CO;2
- Lacey, L. A., Heitzman, C. M., Meisch, M., & Billodeaux, J. (1986). Beecomist-applied *Bacillus sphaericus* for the control of riceland mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2, 548–551. Retrieved from http://citebank.org/sites/default/files/JAMCA_V02_N4_P548-551.pdf
- Lee, Y. W., & Zairi, J. (2006). Susceptibility of laboratory and field-collected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to *Bacillus thuringiensis israelensis* H-14. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22, 97–101. doi:10.2987/8756-971X(2006)22[97:SOLAFJA]2.0.CO;2
- Li, J., Koni, P. A., & Ellar, D. J. (1996). Structure of the mosquitocidal delta-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *Journal of Molecular Biology*, 257, 129–152. doi:10.1006/jmbi.1996.0152
- Li, J. D., Carroll, J., & Ellar, D. J. (1991). Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, 353, 815–821. doi:10.1038/353815a0
- Likitvivanavong, S., Chen, J., Evans, A. M., Bravo, A., Soberon, M., & Gill, S. S. (2011). Multiple receptors as targets of Cry toxins in mosquitoes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 59, 2829–2838. doi:10.1021/jf1036189
- Limpanawat, S., Promdonkoy, B., & Boonserm, P. (2009). The C-terminal domain of BinA is responsible for *Bacillus sphaericus* binary toxin BinA–BinB interaction. *Current Microbiology*, 59, 509–513. doi:10.1007/s00284-009-9468-x
- Liu, H., Cupp, E. W., Guo, A., & Liu, N. (2004). Insecticide resistance in Alabama and Florida mosquito strains of *Aedes albopictus*. *Journal of Medical Entomology*, 41, 946–952. doi:10.1603/0022-2585-41.5.946
- Liu, H., Cupp, E. W., Micher, K. M., Guo, A., & Liu, N. (2004). Insecticide resistance and cross-resistance in Alabama and Florida strains of *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Medical Entomology*, 41, 408–413. doi:10.1603/0022-2585-41.3.408
- Liu, J. W., Porter, A. G., Wee, B. Y., & Thanabalu, T. (1996). New gene from nine *Bacillus sphaericus* strains encoding highly conserved 35.8-kilodalton mosquitocidal toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2174–2176. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167996/pdf/622174.pdf>
- Loke, S. R., Andy-Tan, W. A., Benjamin, S., Lee, H. L., & Sofian-Azirun, M. (2010). Susceptibility of field-collected *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to *Bacillus thuringiensis israelensis* and temephos. *Tropical Biomedicine*, 27, 493–503. Retrieved from http://www.msptm.org/files/493_-_503_Loke_SR.pdf

- Mardini, L. B. L. F., Torres, M. A. N., da Silveira, G. L., & Atz, A. M. V. (2000). *Simulium* spp. control program in Rio Grande do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 211–214. doi:10.1590/S0074-02762000000700036
- Margalit, J., & Dean, D. (1985). The story of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (B.t.i.). *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1, 1–7. Retrieved from <http://citebank.org/uid.php?id=102176>
- Melo-Santos, M. A., Araújo, A. P., Rios, E. M. M., & Regis, L. (2009). Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling. *Biological Control*, 49, 186–191. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.01.011
- Mittal, P. (2005). Laboratory selection to investigate the development of resistance to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* H-14 in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *National Academy Science Letters India*, 28, 281–283. Retrieved from <http://www.mrcindia.org/journal/issues/401020.pdf>
- Moonsom, S., Chaisri, U., Kasinrerak, W., & Angsuthanasombat, C. (2007). Binding characteristics to mosquito-larval midgut proteins of the cloned domain II–III fragment from the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 783–790. doi:10.5483/BMBRep.2007.40.5.783
- Morin, S., Biggs, R. W., Sisterson, M. S., Shriver, L., Ellers-Kirk, C., Higginson, D., ... Tabashnik, B. E. (2003). Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100, 5004–5009. doi:10.1073/pnas.0831036100
- Mulla, M. S., Thavara, U., Tawatsin, A., Chomposri, J., & Su, T. (2003). Emergence of resistance and resistance management in field populations of tropical *Culex quinquefasciatus* to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 19, 39–46. Retrieved from http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/applications/files/13_entomo%20e.pdf
- Mulla, M. S., Thavara, U., Tawatsin, A., Kong-ngamsuk, W., Chomposri, J., & Su, T. (2001). Mosquito larval control with *Bacillus sphaericus*: Reduction in adult populations in low-income communities in Nonthaburi Province, Thailand. *Journal of Vector Ecology*, 26, 221–231. Retrieved from http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/applications/files/12_Entomo%20E.pdf
- Nagamatsu, Y., Toda, S., Koike, T., Miyoshi, Y., Shigematsu, S., & Kogure, M. (1998). Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62, 727–734. doi:10.1271/bbb.62.727
- Nicolas, L., Darriet, F., & Hougard, J. M. (1987). Efficacy of *Bacillus sphaericus* 2362 against larvae of *Anopheles gambiae* under laboratory and field conditions in West Africa. *Medical and Veterinary Entomology*, 1, 157–162. doi:10.1111/j.1365-2915.1987.tb00337.x
- Nicolas, L., Nielsen-Leroux, C., Charles, J.-F., & Delécluse, A. (1993). Respective role of the 42- and 51-kDa components of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 106, 275–279. doi:10.1111/j.1574-6968.1993.tb05976.x
- Nielsen-Leroux, C., & Charles, J.-F. (1992). Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. *European Journal of Biochemistry*, 210, 585–590. doi:10.1111/j.1432-1033.1992.tb17458.x
- Nielsen-Leroux, C., Charles, J.-F., Thiery, I., & Georghiou, G. P. (1995). Resistance in a laboratory population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus* binary toxin is due to a change in the receptor on midgut brush-border membranes. *European Journal of Biochemistry*, 228, 206–210. doi:10.1111/j.1432-1033.1995.tb20251.x
- Nielsen-Leroux, C., Pasquier, F., Charles, J. F., Sinégre, G., Gaven, B., & Pasteur, N. (1997). Resistance to *Bacillus sphaericus* involves different mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) larvae. *Journal of Medical Entomology*, 34, 321–327. Retrieved from [http://www.researchgate.net/publication/14066057_Resistance_to_Bacillus_sphaericus_involves_different_mechanisms_in_Culex_pipiens_\(DipteraCulicidae\)_larvae/file/9fcfd50b74e308cd20.pdf](http://www.researchgate.net/publication/14066057_Resistance_to_Bacillus_sphaericus_involves_different_mechanisms_in_Culex_pipiens_(DipteraCulicidae)_larvae/file/9fcfd50b74e308cd20.pdf)
- Nielsen-Leroux, C., Pasteur, N., Prêtre, J., Charles, J.-f., Sheikh, H. B., & Chevillon, C. (2002). High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the

- complex situation of West Mediterranean countries *Journal of Medical Entomology*, 39, 729–735. doi:10.1603/0022-2585-39.5.729
- Nishiwaki, H., Nakashima, K., Ishida, C., Kawamura, T., & Matsuda, K. (2007). Cloning, functional characterization, and mode of action of a novel insecticidal pore-forming toxin, sphaericolysin, produced by *Bacillus sphaericus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 3404–3411. doi:10.1128/AEM.00021-07
- Ochoa-Campuzano, C., Real, M. D., Martínez-Ramírez, A. C., Bravo, A., & Rausell, C. (2007). An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362, 437–442. doi:10.1016/j.bbrc.2007.07.197
- Oei, C., Hindley, J., & Berry, C. (1990). An analysis of the genes encoding the 51.4- and 41.9-kDa toxins of *Bacillus sphaericus* 2297 by deletion mutagenesis: the construction of fusion proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 72, 265–273. doi:10.1111/j.1574-6968.1990.tb03900.x
- Oei, C., Hindley, J., & Berry, C. (1992). Binding of purified *Bacillus sphaericus* binary toxin and its deletion derivatives to *Culex quinquefasciatus* gut: elucidation of functional binding domains. *Journal of General Microbiology*, 138, 1515–1526. doi:10.1099/00221287-138-7-1515
- Oliveira, C. M. F., Silva-Filha, M. H., Nielsen-Leroux, C., Pei, G., Yuan, Z., & Regis, L. (2004). Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from China and Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 41, 58–64. doi:10.1603/0022-2585-41.1.58
- Opota, O., Charles, J.-F., Warot, S., Pauron, D., & Darboux, I. (2008). Identification and characterization of the receptor for the *Bacillus sphaericus* binary toxin in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 149, 419–427. doi:10.1016/j.cbpb.2007.11.002
- Opota, O., Gauthier, N. C., Doye, A., Berry, C., Gounon, P., Lemichez, E., & Pauron, D. (2011). *Bacillus sphaericus* binary toxin elicits host cell autophagy as a response to intoxication. *PLoS One*, 6, e14682. doi:10.1371/journal.pone.0014682
- Orduz, S., Rojas, W., Correa, M. M., Montoya, A. E., & de Barjac, H. (1992). A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 59, 99–103. doi:10.1016/0022-2011(92)90118-N
- Pardo-López, L., Soberón, M., & Bravo, A. (2013). *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, 3–22. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x
- Paris, M., Boyer, S., Bonin, A., Collado, A., David, J. P., & Despres, L. (2010). Genome scan in the mosquito *Aedes rusticus*: population structure and detection of positive selection after insecticide treatment. *Molecular Ecology*, 19, 325–337. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04437.x
- Paris, M., David, J.-P., & Despres, L. (2011). Fitness costs of resistance to Bti toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Ecotoxicology*, 20, 1184–1194. doi:10.1007/s10646-011-0663-8
- Paris, M., Tetreau, G., Laurent, F., Lelu, M., Despres, L., & David, J.-P. (2011). Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. *Pest Management Science*, 67, 122–128. doi:10.1002/ps.2046
- Park, H. W., Bideshi, D. K., Wirth, M. C., Johnson, J. J., Walton, W. E., & Federici, B. A. (2005). Recombinant larvicidal bacteria with markedly improved efficacy against *Culex* vectors of West Nile virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72, 732–738. Retrieved from <http://www.ajtmh.org/content/72/6/732.full.pdf+html>
- Paul, A., Harrington, L. C., Zhang, L., & Scott, J. G. (2005). Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21, 305–309. doi:10.2987/8756-971X(2005)21[305:IRICPF]2.0.CO;2
- Pei, G., Oliveira, C. M. F., Yuan, Z., Nielsen-LeRoux, C., Silva-Filha, M. H., Yan, J., & Regis, L. (2002). A strain of *Bacillus sphaericus* causes slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3003–3009. doi:10.1128/AEM.68.6.3003-3009.2002
- Perez, C., Fernandez, L. E., Sun, J., Folch, J. L., Gill, S. S., Soberón, M. & Bravo, A. (2005). *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as

- a membrane-bound receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102, 18303–18308. doi:10.1073/pnas.0505494102
- Pérez, C., Muñoz-Garay, C., Portugal, L. C., Sánchez, J., Gill, S. S., Soberón, M., & Bravo, A. (2007). *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. *Cellular Microbiology*, 9, 2931–2937. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01007.x
- Pigott, C. R., & Ellar, D. J. (2007). Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71, 255–281. doi:10.1128/MMBR.00034-06
- Poncet, S., Anello, G., Delécluse, A., Klier, A., & Rapoport, G. (1993). Role of the CryIVD polypeptide in the overall toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3928–3930. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC182551/pdf/aem00040-0424.pdf>
- Popova-Butler, A., & Dean, D. H. (2009). Proteomic analysis of the mosquito *Aedes aegypti* midgut brush border membrane vesicles. *Journal of Insect Physiology*, 55, 264–272. doi:10.1016/j.jinsphys.2008.12.008
- Rao, D. R., Mani, T. R., Rajendran, R., Joseph, A. S., Gajanana, A., & Reuben, R. (1995). Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 11, 1–5. Retrieved from <http://citebank.org/uid.php?id=103362>
- Ravoahangimalala, O., & Charles, J.-F. (1995). In vitro binding of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* individual toxins to midgut cells of *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae). *FEBS Letters*, 362, 111–115. doi:10.1016/0014-5793(95)00220-4
- Regis, L., Silva-Filha, M. H. N. L., Oliveira, C. M. F. d., Rios, E. M., Silva, S. B. d., & Furtado, A. F. (1995). Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90, 115–119. doi:10.1590/S0074-02761995000100022
- Regis, L., Silva-Filha, M. H., Nielsen-LeRoux, C., & Charles, J.-F. (2001). *Bacteriological larvicides* of dipteran disease vectors. *Trends in Parasitology*, 17, 377–380. doi:10.1016/S1471-4922(01)01953-5
- Rodcharoen, J., Mulla, M. S., & Chaney, J. D. (1991). Microbial larvicides for the control of nuisance aquatic midges (Diptera: Chironomidae) inhabiting mesocosms and man-made lakes in California. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7, 56–62. Retrieved from <http://citebank.org/uid.php?id=102967>
- Rodríguez-Almázan, C., Reyes, E. Z., Zuñiga-Navarrete, F., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Evans, A. M., ... Soberón, M. (2012). Cadherin binding is not a limiting step for *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba toxicity to *Aedes aegypti* larvae. *Biochemistry Journal*, 443, 711–717. doi:10.1042/BJ20111579
- Romão, T. P., de Melo Chalegre, K. D., Key, S., Ayres, C. F., Fontes de Oliveira, C. M., de Melo-Neto, O. P., & Silva-Filha, M. H. (2006). A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its alpha-glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. *FEBS Journal*, 273, 1556–1568. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05177.x
- Romão, T. P., de Melo-Neto, O. P., & Silva-Filha, M. H. (2011). The N-terminal third of the BinB subunit from the *Bacillus sphaericus* binary toxin is sufficient for its interaction with midgut receptors in *Culex quinquefasciatus*. *FEMS Microbiology Letters*, 321, 167–174. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02325.x
- Saengwiman, S., Aroonkesorn, A., Dedvisitsakul, P., Sakdee, S., Leetachewa, S., Angsuthanasombat, C., & Pootanakit, K. (2011). In vivo identification of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptors by RNA interference knockdown of glycosylphosphatidylinositol-linked aminopeptidase N transcripts in *Aedes aegypti* larvae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407, 708–713. doi:10.1016/j.bbrc.2011.03.085
- Saleh, M. S., El-Meniawi, F. A., Kelada, N. L., & Zahran, H. M. (2003). Resistance development in mosquito larvae *Culex pipiens* to the bacterial agent *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Journal of Applied Entomology*, 127, 29–32. doi:10.1046/j.1439-0418.2003.00703.x
- Sanitt, P., Promdonkoy, B., & Boonserm, P. (2008). Targeted mutagenesis at charged residues in *Bacillus sphaericus* BinA toxin affects mosquito-larvicidal activity. *Current Microbiology*, 57, 230–234. doi:10.1007/s00284-008-9180-2

- Seleena, P., Lee, H. L., & Lecadet, M. M. (1995). A new serovar of *Bacillus thuringiensis* possessing 28a28c flagellar antigenic structure: *Bacillus thuringiensis* serovar *jegathesan*, selectively toxic against mosquito larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *11*, 471–473. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8825511>
- Shanmugavelu, M., Rajamohan, F., Kathirvel, M., Elangovan, G., Dean, D. H., & Jayaraman, K. (1998). Functional complementation of nontoxic mutant binary toxins of *Bacillus sphaericus* 1593M generated by site-directed mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*, 756–759. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/64/2/756.full.pdf+html>
- Silva-Filha, M. H., Nielsen-Leroux, C., & Charles, J. F. (1997). Binding kinetics of *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush-border membranes of *Anopheles* and *Culex* sp. mosquito larvae. *European Journal of Biochemistry*, *247*, 754–761. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00754.x
- Silva-Filha, M. H., Nielsen-LeRoux, C., & Charles, J. F. (1999). Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *29*, 711–721. doi:10.1016/S0965-1748(99)00047-8
- Silva-Filha, M. H., Oliveira, C. M., Regis, L., Yuan, Z., Rico, C. M., & Nielsen-LeRoux, C. (2004). Two *Bacillus sphaericus* binary toxins share the midgut receptor binding site: implications for resistance of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) larvae. *FEMS Microbiology Letters*, *241*, 185–191. doi:10.1016/j.femsle.2004.10.018
- Silva-Filha, M. H. N. L., Chalegre, K. D., Anastacio, D. B., Oliveira, C. M. F., Silva, S. B., Acioli, R. V., ... Regis, L. (2008). *Culex quinquefasciatus* field populations subjected to treatment with *Bacillus sphaericus* did not display high resistance levels. *Biological Control*, *44*, 227–234. doi:10.1016/j.biocontrol.2007.10.002
- Silva-Filha, M. H. N. L., & Peixoto, C. A. (2003). Immunocytochemical localization of the *Bacillus sphaericus* toxin components in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *77*, 138–146. doi:10.1016/j.pestbp.2003.07.002
- Silva-Filha, M. H. N. L., Regis, L., Nielsen-LeRoux, C., & Charles, J.-F. (1995). Low level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-treated population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Economic Entomology*, *88*, 525–530.
- Singer, S. (1977). Isolation and development of bacterial pathogens in vectors. In: J. D. Briggs (Ed.), *Biological regulation of vectors* (pp. 3–18). DHEW Publication No. (NIH) 77–1180. Bethesda, MD: National Institute of Health.
- Singh, G. J. P., & Gill, S. S. (1988). An electron microscope study of the toxic action of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, *52*, 237–247. doi:10.1016/0022-2011(88)90131-0
- Skovmand, O., Ouedraogo, T. D. A., Sanogo, E., Samuelsen, H., Toé, L. P., & Baldet, T. (2009). Impact of slow-release *Bacillus sphaericus* granules on mosquito populations followed in a tropical urban environment *Journal of Medical Entomology*, *46*, 67–76. doi:10.1603/033.046.0109
- Skovmand, O., & Sanogo, E. (1999). Experimental formulations of *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis israelensis* against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in Burkina Faso. *Journal of Medical Entomology*, *36*, 62–67. Retrieved from <http://esa.publisher.ingentaconnect.com/content/esa/jme/1999/00000036/00000001/art00009>
- Soberón, M., Fernández, L. E., Pérez, C., Gill, S. S., & Bravo, A. (2007). Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon*, *49*, 597–600. doi:10.1016/j.toxicon.2006.11.008
- Srisucharitpanit, K., Inchana, P., Rungrod, A., Promdonkoy, B., & Boonserm, P. (2012). Expression and purification of the active soluble form of *Bacillus sphaericus* binary toxin for structural analysis. *Protein Expression and Purification*, *82*, 368–372. doi:10.1016/j.pep.2012.02.009
- Srisucharitpanit, K., Yao, M., Chimnarong, S., Promdonkoy, B., Tanaka, I., & Boonserm, P. (2013). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the functional form of BinB binary toxin from *Bacillus sphaericus*. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Crystalization Communications*, *69*, 170–173. doi:10.1107/S1744309113000110

- Tabashnik, B. E., Biggs, R. W., Fabrick, J. A., Gassmann, A. J., Dennehy, T. J., Carriere, Y., & Morin, S. (2006). High-level resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin cry1Ac and cadherin genotype in pink bollworm. *Journal of Economic Entomology*, *99*, 2125–2131. doi:10.1603/0022-0493-99.6.2125
- Tabashnik, B. E., Carrière, Y., Dennehy, T. J., Morin, S., Sisterson, M. S., Roush, R. T., Shelton, A. M., & Zhao, J.-Z. (2003). Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field. *Journal of Economic Entomology*, *96*, 1031–1038. doi:10.1603/0022-0493-96.4.1031
- Tabashnik, B. E., Finson, N., Johnson, M. W., & Moar, W. J. (1993). Resistance to Toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Causes Minimal Cross-Resistance to *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* in the Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Applied Environmental Microbiology*, *59*, 1332–1335. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/59/5/1332.long>
- Tabashnik, B. E., Liu, Y.-B., Dennehy, T. J., Sims, M. A., Sisterson, M. S., Biggs, R. W., & Carrière, Y. (2002). Inheritance of resistance to Bt toxin cryIac in a field-derived strain of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Economic Entomology*, *95*, 1018–1026. doi:10.1603/0022-0493-95.5.1018
- Tetreau, G., Bayyareddy, K., Jones, C. M., Stalinski, R., Riaz, M. A., Paris, M., David, J. P., Adang, M. J., & Després, L. (2012). Larval midgut modifications associated with Bti resistance in the yellow fever mosquito using proteomic and transcriptomic approaches. *BMC Genomics*, *13*, 248. doi:10.1186/1471-2164-13-248
- Thanabalu, T., Hindley, J., & Berry, C. (1992). Proteolytic processing of the mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. *Journal of Bacteriology*, *174*, 5051–5056. Retrieved from <http://jlb.asm.org/content/174/15/5051.long>
- Thanabalu, T., Hindley, J., Brenner, S., Oei, C., & Berry, C. (1992). Expression of the mosquitocidal toxins of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* by recombinant *Caulobacter crescentus*, a vehicle for biological control of aquatic insect larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*, 905–910. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/58/3/905.long>
- Thanabalu, T., Hindley, J., Jackson-Yap, J., & Berry, C. (1991). Cloning, sequencing, and expression of a gene encoding a 100-kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. *Journal of Bacteriology*, *173*, 2776–2785. Retrieved from <http://jlb.asm.org/content/173/9/2776.long>
- Thanabalu, T., & Porter, A. G. (1996). A *Bacillus sphaericus* gene encoding a novel type of mosquitocidal toxin of 31.8 kDa. *Gene*, *170*, 85–89. doi:10.1016/0378-1119(95)00836-5
- Thomas, W. E., & Ellar, D. J. (1983). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* insecticidal delta-endotoxin. *FEBS Letters*, *154*, 362–368. doi:10.1016/0014-5793(83)80183-5
- Thorne, L., Garduno, F., Thompson, T., Decker, D., Zounes, M., Wild, M., . . . Pollock, T. J. (1986). Structural similarity between the lepidoptera- and diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. “*kurstaki*” and “*israelensis*”. *Journal of Bacteriology*, *166*, 801–811. Retrieved from <http://jlb.asm.org/content/166/3/801.long>
- Townson, H., Nathan, M. B., Zaim, M., Guillet, P., Manga, L., Bos, R., & Kindhauser, M. (2005). Exploiting the potential of vector control for disease prevention. *Bulletin of the World Health Organization*, *83*, 942–947. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1590/S0042-96862005001200017>
- Vachon, V., Laprade, R., & Schwartz, J.-L. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*, *111*, 1–12.
- 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*. *Journal of Biological Chemistry*, *270*, 5490–5494. doi:10.1074/jbc.270.10.5490
- Valaitis, A. P., Jenkins, J. L., Lee, M. K., Dean, D. H., & Garner, K. J. (2001). Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *46*, 186–200. doi:10.1002/arch.1028
- Van Rie, J., Jansens, S., Hofte, H., Degheele, D., & Van Mellaert, H. (1990). Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus*

- thuringiensis* delta-endotoxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1378–1385. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/56/5/1378.long>
- Vasquez, M. I., Violaris, M., Hadjivassilis, A., & Wirth, M. C. (2009). Susceptibility of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) field populations in Cyprus to conventional organic insecticides, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, and methoprene. *Journal of Medical Entomology*, 46, 881–887. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1603/033.046.0421>
- Wei, S., Cai, Q., Cai, Y., & Yuan, Z. (2007). Lack of cross-resistance to Mtx1 from *Bacillus sphaericus* in *B. sphaericus*-resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Pest Management Science*, 63, 190–193. doi:10.1002/ps.1319
- Weiser, J. (1984). A mosquito-virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from northern Nigeria. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, 139, 57–60. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0232439384800335>
- Wickremesingue, R. S. B., & Mendis, C. L. (1980). *Bacillus sphaericus* spore from Sri Lanka demonstrating rapid larvicidal activity on *Culex quinquefasciatus*. *Mosquito News*, 40, 387–389.
- Wirth, M. C. (2010). Mosquito resistance to bacterial larvicidal toxins. *The Open Toxinology Journal*, 3, 101–115. doi:10.2174/1875414701003010126
- Wirth, M. C., Federici, B. A., & Walton, W. E. (2000). Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* synergizes activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1093–1097.
- Wirth, M. C., Ferrari, J. A., & Georghiou, G. P. (2001). Baseline susceptibility to bacterial insecticides in populations of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) from California and from the Mediterranean Island of Cyprus. *Journal of Economic Entomology*, 94, 920–928.
- Wirth, M. C., Georghiou, G. P., Malik, J. I., & Abro, G. H. (2000). Laboratory selection for resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from California, USA. *Journal of Medical Entomology*, 37, 534–540. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-37.4.534>
- Wirth, M. C., Jiannino, J. A., Federici, B. A., & Walton, W. E. (2004). Synergy between toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus*. *Journal of Medical Entomology*, 41, 935–941. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-41.5.935>
- Wirth, M. C., Park, H. W., Walton, W. E., & Federici, B. A. (2005). Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 185–189. doi:10.1128/AEM.71.1.185-189.2005
- Wirth, M. C., Walton, W. E., & Federici, B. A. (2000). Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* restores toxicity of *Bacillus sphaericus* against resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 37, 401–407. Retrieved from [http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585\(2000\)037\[0401:CFBTRT\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585(2000)037[0401:CFBTRT]2.0.CO;2)
- Wirth, M. C., Walton, W. E., & Federici, B. A. (2012). Inheritance, stability, and dominance of cry resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) selected with the three cry toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Journal of Medical Entomology*, 49, 886–894. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1603/ME11192>
- Wirth, M. C., Yang, Y., Walton, W. E., Federici, B. A., & Berry, C. (2007). Mtx toxins synergize *Bacillus sphaericus* and Cry11Aa against susceptible and insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6066–6071. doi:10.1128/AEM.00654-07
- Xu, X., Yu, L., & Wu, Y. (2005). Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 948–954. doi:10.1128/AEM.71.2.948-954.2005
- Yuan, Z., Rang, C., Maroun, R. C., Juarez-Perez, V., Frutos, R., Pasteur, N., ... Nielsen-Leroux, C. (2001). Identification and molecular structural prediction analysis of a toxicity determinant in the *Bacillus sphaericus* crystal larvicidal toxin. *European Journal of Biochemistry/FEBS Journal*, 268, 2751–2760. doi:10.1046/j.1432-1327.2001.02176.x
- Yuan, Z. M., Pei, G. F., Regis, L., Nielsen-Leroux, C., & Cai, Q. X. (2003). Cross-resistance between strains of *Bacillus sphaericus* but not *B. thuringiensis israelensis* in colonies of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 17, 251–256. doi:10.1046/j.1365-2915.2003.00429.x

- Yuan, Z. M., Zhang, Y. M., & Liu, E. Y. (2000). High-level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from Southern China. *Biocontrol Science and Technology*, 10, 43–51. doi:10.1080/09583150029378
- Zhang, R., Hua, G., Andacht, T. M., & Adang, M. J. (2008). A 106-kDa aminopeptidase is a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Biochemistry*, 47, 11263–11272. doi:10.1021/bi801181g
- Zhang, S., Cheng, H., Gao, Y., Wang, G., Liang, G., & Wu, K. (2009). Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39, 421–429. doi:10.1016/j.ibmb.2009.04.003
- Zhang, W., Crickmore, N., George, Z., Xie, L., He, Y. Q., Li, Y., ... Fang, X. (2012). Characterization of a new highly mosquitocidal isolate of *Bacillus thuringiensis*: an alternative to Bti?. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109, 217–222. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2011.11.003>
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Taussig, 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 9897–9902. doi:10.1073/pnas.0604017103

9 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a base molecular da interação da toxina Bin com as α -glicosidases Cqm1 e Aam1 de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*, respectivamente, que são muito similares, mas conferem diferentes padrões de susceptibilidade a essas espécies. A primeira parte do estudo visou avaliar as características da proteína Aam1 de *Ae. aegypti* e as razões da refratariedade dessa espécie à toxina Bin. A primeira hipótese para a ausência de ligação da toxina ao epitélio intestinal das larvas de *Ae. aegypti* que seria a ocorrência de processamento proteolítico incorreto, necessário à ativação da toxina, foi elucidada por estudos prévios. Estes demonstraram que o processamento da toxina Bin em larvas de *Ae. aegypti* ocorre de maneira semelhante ao que ocorre em *Culex quinquefasciatus*, uma espécie susceptível a Lsp (CHARLES; DE BARJAC, 1981; NICOLAS; LECROISEY; CHARLES, 1990; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992).

A expressão da Aam1 em outras fases do desenvolvimento também poderia explicar a refratariedade do *Ae. aegypti*. No entanto, os resultados desse estudo refutam esta hipótese, pois o gene *aam1* é transcrito e a proteína é expressa nas fases de larva e adulto, o que descarta o problema da expressão estágio-específica. Em *Anopheles gambiae*, algumas α -glicosidases estágio-específicas foram identificadas e são expressas somente na fase adulta (ZHENG et al., 1995). No presente estudo também foram encontradas proteínas parálogas à Aam1 que são expressas somente na fase adulta dos insetos. Possivelmente, a expressão estágio específica de α -glicosidases está relacionada às diferentes dietas de açúcares ingeridas (SOUZA-NETO et al., 2007).

Uma falha na expressão dos receptores ou mesmo a produção de receptores desprovidos de âncora GPI e, portanto, expressos na forma solúvel seria outra possibilidade. Alguns alelos de resistência caracterizados em colônias ou populações de mosquitos do complexo *Culex pipiens* causam a expressão do receptor sob a forma solúvel, o que o torna indisponível no epitélio intestinal (CHALEGRE et al., 2012; DARBOUX et al., 2002, 2007; GUO et al., 2013; ROMÃO et al., 2006). Em estudos com α -glicosidases de mosquitos, demonstrou-se que algumas destas moléculas podem ser expressas tanto sob a forma de membrana quanto solúvel, tal como foi observado em α -glicosidases de *Anopheles aquasalis* (SOUZA-NETO et al., 2007). A expressão sob a forma solúvel seria um impedimento natural para a ação da toxina Bin, pois ela necessita agir em receptores de membrana nas células do epitélio intestinal para desencadear os efeitos citopatológicos. No caso da proteína Aam1, foi detectada a sequência que sinaliza a inserção da âncora GPI e avaliações bioquímicas

mostraram que a proteína é, de fato, ligada ao epitélio via GPI, confirmando a sua correta localização (FERREIRA et al., 2010).

Do ponto de vista quantitativo, os dados obtidos neste estudo demonstraram que a proteína Aam1 é expressa no *microvilli* intestinal das larvas em níveis semelhantes, ou até superiores, aos do receptor Cqm1. A disponibilidade de uma concentração suficiente de receptores (B_{max}) no epitélio é de grande relevância, assim como a afinidade de ligação da toxina Bin aos receptores, que é medida pela constante de dissociação (K_d) do complexo toxina-receptor. Estudos prévios demonstraram que a concentração de receptores Cqm1 em BBMF de *C. quinquefasciatus*, a espécie mais susceptível a Lsp, pode ser em torno de 7-10 pmol/ mg de proteínas totais, enquanto que em *An. stephensi* e *An. gambiae*, que são espécies moderadamente susceptíveis, o valor é inferior a 5 pmol/mg (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; NIELSEN-LEROUX et al., 1995; NIELSEN-LEROUX et al., 1997; SILVA-FILHA; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1997; SILVA-FILHA et al., 2004). Os dados de Ferreira et al. (2010) indicam que se a Aam1 tivesse capacidade de ligação à toxina Bin, a concentração de receptores poderia ser superior à de Cqm1, mostrando que este parâmetro também não está implicado na refratariedade das larvas à toxina.

A avaliação funcional da Aam1 demonstrou que, apesar de disponível no epitélio intestinal das larvas, esta proteína é incapaz de ligar-se à toxina Bin. Neste caso, as diferenças existentes entre a Aam1 e a Cqm1, dentre elas o padrão de modificações pós-traducionais e de suas seqüências primárias, poderiam ocasionar alterações estruturais entre as proteínas e serem críticas para a interação com a toxina Bin. A avaliação do padrão de migração de Cqm1 e Aam1, sob condições semi-desnaturantes, sugere que existem diferenças estruturais marcantes. Foi observado um aumento considerável do peso molecular aparente da proteína Cqm1 na sua forma nativa, enquanto que em condições desnaturantes, esta proteína apresenta menor peso aparente. Adicionalmente, a produção da Cqm1 em um sistema de expressão em lisado de reticulócitos de coelho resultou em uma proteína incapaz de ligar à toxina Bin, sugerindo que, provavelmente do ponto de vista conformacional, a proteína não foi processada corretamente (FERREIRA, 2009). Estudos com a Cqm1 sob a forma desnaturada por inativação termal demonstraram que, nessa condição, a proteína é incapaz de se ligar à toxina Bin, sugerindo que a conformação nativa é essencial para funcionalidade (FERREIRA, 2009).

Essas evidências confirmam que a conformação é imprescindível para a funcionalidade da Cqm1 e a dependência da estrutura da molécula para sua funcionalidade é, inclusive, um fato limitante para os estudos de caracterização de proteínas. Em geral, as

análises de receptores e seus ligantes em lepidópteros e dípteros frequentemente envolvem etapas de desnaturação e este fator não interfere na capacidade de interação com as toxinas (FERNANDEZ et al., 2006; HUA et al., 2008; YAMAGUCHI et al., 2013). Além disso, as proteínas a serem analisadas são frequentemente expressas em células de *E. coli* e apresentam funcionalidade nesta condição, o que oferece maior rapidez e facilidade operacional do que os sistemas eucariotos.

A predição de glicosilações, a partir da análise destas sequências de proteínas, demonstrou que a Cqm1 apresenta três sítios de glicosilação, sendo que dois deles são semelhantes à Aam1 e um é exclusivo da Cqm1. A avaliação das proteínas Cqm1 nativas com uma endoglicosidase sugeriu que esta proteína não é glicosilada, apesar dos sítios preditos de glicosilação. A proteína Cqm1 nativa e tratada com a PNGase permaneceu capaz de ligar-se à toxina Bin indicando que, mesmo que haja carboidratos na molécula, e que a remoção destes não tenha sido visualizada pelo método utilizado, eles não interferem na capacidade de ligação à toxina Bin. A proteína Cqm1 MutNLT, modificada em um sítio com maior potencial de glicosilação e exclusivo da proteína Cqm1, também manteve a sua capacidade de ligação à toxina Bin, indicando mais uma vez que a interação do receptor Cqm1 com a toxina Bin seria glicano-independente. Esse resultado é semelhante ao observado para a APN de *Ae. aegypti*, cuja ligação à toxina Cry11Aa também não depende de glicanos (CHEN et al., 2009b). Por outro lado, este modelo difere de vários da literatura em que os epitopos de ligação da toxina Cry1Ac são glicanos presentes em APNs e ALPs de algumas espécies de insetos. Exemplos clássicos são a ligação da toxina Cry1Ac às ALPs de *Heliothis virescens* e *Helicoverpa armigera*, ao *microvilli* intestinal de *M. sexta*, bem como a dos gliconjugados de *C. elegans* à Cry5B (GRIFFITTS et al., 2005; JURAT-FUENTES; ADANG, 2004; KNOWLES et al., 1991). Estes dados reforçam a importância de glicosilações em receptores-alvo em insetos como epitopos para a interação com toxinas inseticidas.

A proteína Aam1 apresenta seis sítios preditos de glicosilação na sua sequência e a análise de proteínas nativas demonstrou que essa molécula é glicosilada, o que está de acordo com os dados de predição. A quantidade de glicanos na Aam1 nativa é substantiva, visto que a remoção dos carboidratos resultou em uma proteína cerca de 13 kDa menor. A remoção das glicosilações não alterou o padrão de afinidade da proteína à toxina Bin, pois a Aam1 permaneceu incapaz de interagir com a toxina *in vitro*, refutando a hipótese de que os glicanos poderiam bloquear ou dificultar, de alguma forma, o acesso ao sítio de ligação à Bin. Conforme revisado em Altman et al. (1999) a função dos glicanos é de grande importância durante o processamento de proteínas, mas, é possível que após o correto dobramento a

remoção das glicosilações não interfira na estrutura e função da molécula. Em *Drosophila melanogaster*, por exemplo, observou-se que as glicosilações são necessárias durante a síntese da proteína rodopsina, no entanto, após a obtenção da conformação correta, torna-se dispensável (KATANOSAKA et al., 1998).

A avaliação das proteínas Aam1 e Cqm1 mutantes em sítios de glicosilação demonstrou que os sítios $_{142}\text{NET}_{144}$, $_{310}\text{NRT}_{312}$, $_{431}\text{NAT}_{433}$ e $_{533}\text{NST}_{535}$ preditos na Aam1 sinalizam, de fato, a inserção de glicanos. Outro aspecto observado é que os potenciais de glicosilação não correspondem ao padrão observado *in vivo*, ou seja, os sítios $_{142}\text{NET}_{144}$, $_{431}\text{NAT}_{433}$ e $_{533}\text{NST}_{535}$, que possuem baixo potencial, apresentam inserção de glicanos, da mesma forma que o sítio $_{310}\text{NRT}_{312}$, com alto potencial. A remoção parcial destes glicanos também não interferiu na ligação das proteínas à toxina Bin, sugerindo que estes carboidratos não camuflam epitopos de ligação de Cqm1 que poderiam estar localizados nos próprios sítios de glicosilação na Aam1, nem parecem interferir impedindo o acesso da toxina Bin a epitopos que poderiam estar localizados na proximidade destes sítios. Os dados demonstram uma clara diferença de glicosilações entre Cqm1 e Aam1, mas também sugerem que esta característica não influencia na capacidade de ligação à toxina Bin. É importante notar que a visualização dos sítios de glicosilação nos modelos estruturais de Cqm1 e Aam1 revelou que os quatro sítios onde ocorre comprovadamente a inserção de glicanos ($_{142}\text{NET}_{144}$, $_{310}\text{NRT}_{312}$, $_{431}\text{NAT}_{433}$ e $_{533}\text{NST}_{535}$), estão localizados em regiões expostas da proteína. Os dois outros sítios ($_{126}\text{NHS}_{128}$ e $_{414}\text{NRT}_{416}$) são idênticos na Cqm1 e, na estrutura das proteínas, estão localizados na região interna, sugerindo que não há inserção de glicanos, conforme indicam os dados *in vitro*. A glicosilação da Aam1 provavelmente deve conferir a esta proteína algum atributo ainda não avaliado. Os dados de Ferreira et al. (submetido) apontaram que a atividade catalítica da Aam1 é muito superior à Cqm1 e a possível influência dos glicanos nessa função será investigada, em estudos futuros, nas proteínas mutantes nos sítios de glicosilação.

Devido à necessidade de obtenção de proteínas com processamento adequado e inserção de modificações pós-traducionais, optou-se pela utilização do sistema de expressão eucariótico Sf9 (FERREIRA et al., 2010). Tais características não podem ser obtidas em sistemas de expressão procarióticos, pois estes não dispõem da maquinaria necessária para o processamento protéico. Além disso, estudos utilizando sistemas eucarióticos como o de lisado de reticulócitos de coelho demonstraram que o processamento protéico não ocorreu adequadamente. Nesse sistema foi observado que a proteína Cqm1 foi incapaz de ligar à toxina Bin e a Aam1 foi expressa em um tamanho inferior ao esperado, possivelmente pela

ausência de glicosilações, visto que esse sistema não possui a maquinaria necessária para a inserção desse tipo de modificação (FERREIRA, 2009).

O sistema de expressão em células Sf9 é amplamente utilizado para a obtenção de proteínas recombinantes, devido à capacidade de permitir o processamento e dobramento das proteínas, bem como a inserção de modificações pós-traducionais (ALTMANN et al., 1999). As proteínas Cqm1 e Aam1, produzidas no sistema de expressão em células Sf9, apresentaram características semelhantes às observadas para as proteínas nativas. Ambas apresentaram atividade α -glicosidase, visto que pertencem a essa classe de enzimas, e pesos moleculares compatíveis com os observados para as proteínas nativas, indicando que, a princípio, a estrutura protéica foi mantida. A proteína Aam1 recombinante apresentou a inserção de carboidratos demonstrando que o padrão de glicosilação é similar ao das proteínas nativas. Cqm1 e Aam1 também mantiveram os padrões de interação à toxina Bin das proteínas nativas, o que demonstra a eficiência do sistema de expressão em células Sf9 na obtenção de proteínas analisadas neste estudo. A proteína Cpm1 recombinante também foi produzida neste sistema e avaliada funcionalmente com sucesso (DARBOUX et al., 2007; DARBOUX et al., 2002).

Neste estudo foram investigadas diferenças relacionadas ao padrão de glicosilação entre as proteínas Cqm1 e Aam1 e foram identificadas diferenças entre as sequências primárias, que podem interferir na estrutura das proteínas. Além disso, conforme foi observado, o enovelamento da proteína Cqm1 é fundamental para a funcionalidade. Por esta razão, foi importante mapear esta região através de proteínas quiméricas, contendo parte da proteína Cqm1 e parte da Aam1. Esta avaliação mostrou que o sítio de ligação à toxina se encontra na porção N-terminal da Cqm1, compreendida entre os aminoácidos S129 e A312. Dados preliminares demonstraram que o sítio de ligação à toxina Bin se encontra na porção N-terminal da proteína Cqm1 (GUO et al., 2013; ROMÃO et al., 2006), entretanto os dados desses trabalhos foram obtidos utilizando um sistema de expressão procarioto, o que limita a consistência dos dados encontrados. A região S129-A312 contém um alto grau de conservação entre Cqm1 e Aam1, que inclui parte dos sítios catalíticos de α -glicosidase. A avaliação da possível associação entre os sítios de ligação à toxina Bin e os sítios catalíticos sugeriu que estes não parecem estar relacionados, pois nenhuma interferência na atividade α -glicosidase foi observada em moléculas Cqm1 ligadas à toxina Bin. Este aspecto tem sido pouco estudado na literatura, apesar de parte das proteínas que agem como receptores de toxinas apresentarem uma função primária na digestão.

A partir desta região mapeada, a busca extensiva de resíduos envolvidos na ligação revelou que os aminoácidos $_{159}\text{GG}_{160}$, localizados em uma alça de uma região exposta na estrutura da Cqm1, são críticos para a interação com a toxina Bin. Apesar do elevado número de resíduos não conservados entre Cqm1 e Aam1 terem sido investigados, apenas dois resíduos ($_{159}\text{GG}_{160}$) mostraram um papel na ligação. Ainda não se sabe se a toxina liga-se especificamente a estes resíduos ou se eles são importantes para a conformação da região de ligação propriamente dita. Entretanto, os dois resíduos de glicina são, sem dúvida, essenciais pois mutações nestes resíduos aboliram a capacidade de ligação, ilustrando que modificações em poucos resíduos podem ser determinantes para alterar a interação toxina-receptor. Um estudo recente demonstrou que a toxina Cry2Ab do *B. thuringiensis* sorovar. *Kurstaki* apresenta baixa atividade para larvas de *An. gambiae*, no entanto, quando modificada em um único aminoácido apresentou uma elevação da toxicidade para as larvas desta espécie (MCNEIL; DEAN, 2011).

A localização deste epitopo em uma região de alça, conforme os dados de modelagem, é consistente com os dados de caracterização de epitopos nas toxinas Cry, que são localizados principalmente em regiões de alça do domínio II, o que propicia as interações das moléculas (FERNANDEZ et al., 2005; GOMEZ et al., 2003; GOMEZ et al., 2001). Epitopos de ligação da toxina Cry1Ab em receptores de lepidópteros foram identificados e, no caso da caderina Bt-R1 de *M. sexta*, tal epitopo corresponde a uma região de oito aminoácidos, localizados na região CR12 da molécula (GOMEZ et al., 2001; GRIKO et al., 2007; HUA; JURAT-FUENTES; ADANG, 2004). Em *Ae. aegypti*, os epitopos de ligação da toxina Cry11Aa foram mapeados nas regiões R59-G102 e N257-I296 de uma ALP, mostrando que segmentos independentes ou localizados em regiões distantes podem ser requeridos para a ligação (FERNANDEZ et al., 2009). Os resíduos $_{159}\text{GG}_{160}$ estão inseridos em um motivo de aminoácidos ($_{155}\text{PATGGG}_{160}$) em que quatro deles ($_{155}\text{PA}_{156}$; $_{159}\text{GG}_{160}$) são divergentes em Aam1 ($_{158}\text{AE}_{159}$; $_{162}\text{KL}_{163}$). Adicionalmente, a respectiva região de alça em Aam1 é formada por mais cinco aminoácidos na sua sequência, que estão ausentes na Cqm1 e que conferem uma disposição espacial distinta desta alça na Aam1. Neste segmento, portanto, foi observada uma sequência com baixa conservação de aminoácidos, além de um perfil hidropático e uma disposição estrutural distinta destes resíduos.

Os dados obtidos são consistentes com a importância desse segmento e dos resíduos $_{159}\text{GG}_{160}$ para a ligação da toxina Bin, no entanto, é possível que outros resíduos possam estar envolvidos. A modelagem da proteína Cqm1 mutante revelou que a modificação da região crítica para a interação ocasionou também alterações em outras áreas da molécula, sugerindo

que poderia haver mais de uma região envolvida na ligação da Cqm1 à toxina Bin. A análise da proteína mutante Cqm1_{BP-del} também corrobora esses dados. Essa proteína é desprovida de 66 aminoácidos (V393-Q458) e não possui atividade catalítica, apesar dos sítios catalíticos estarem localizados em outra região da molécula (DARBOUX et al., 2007). A maioria dos aminoácidos da Cqm1, divergentes da Aam1 e localizados nessa região, foi analisada nesse estudo, porém nenhum deles interferiu na capacidade de ligação. Este resultado sugere que a deleção tem efeito na conformação protéica e que os resíduos desta região não estão envolvidos na ligação à toxina. A modelagem dessa proteína de fato aponta que ocorrem divergências em outras regiões da proteína, inclusive na região de alça identificada como crítica para a interação da Cqm1 com a toxina. Este conjunto de dados indica que a deleção de 66 aminoácidos afetou a estrutura e o enovelamento da molécula, influenciando os epitopos de ligação à Bin e os sítios catalíticos.

A identificação de um epitopo crítico para a ligação da toxina Bin na proteína Cqm1 direcionou para uma investigação, que está em andamento, para elucidar a base molecular da refratariedade das larvas de *Ae. aegypti*. Durante esse trabalho, as análises levaram à conclusão de que diferenças nas proteínas Cqm1 e Aam1, no segmento ₁₅₅PATGGG₁₆₀, podem ser responsáveis pela diferença de afinidades de ligação à toxina Bin, o que acarretaria portanto a refratariedade *in vivo* de *Ae. aegypti*. Neste contexto, o significado do epitopo da Cqm1 pode ser investigado através da modelagem, produção e avaliação de proteínas Aam1 modificadas nesse sítio.

A avaliação funcional destas proteínas mutantes poderá elucidar se esta diferença será determinante para reverter o fenótipo da Aam1. Se a Aam1 mutante no sítio ₁₅₄GRQNAETGKLD₁₆₄ apresentar capacidade de ligação à toxina Bin, será possível fazer uma análise quantitativa da afinidade de ligação desta proteína em relação à Cqm1. Ou seja, será possível avaliar se esta modificação poderia conferir um *status* de ligação similar. Se a modificação da Aam1 não resultar na capacidade de ligação, outros aminoácidos serão avaliados. A análise de modelagem mostrou que as mudanças no segmento ₁₅₄GRQNAETGKLD₁₆₄ afetam a apresentação de outras regiões que, supostamente, poderiam fazer parte deste epitopo. Serão produzidas e avaliadas proteínas Aam1 mutantes neste sítio, associado a mudanças em outros sítios candidatos. Outro aspecto importante é que a estrutura da toxina Bin ainda não está disponível e sua publicação permitirá a realização de estudos de modelagem da interação (docking) das proteínas, para determinar outros segmentos que poderiam estar envolvidos.

10 CONCLUSÕES

- a) O sítio de ligação da toxina Bin no receptor Cqm1 não depende de glicanos, está localizado em uma região de alça da porção N-terminal da proteína e os resíduos ¹⁵⁹GG₁₆₀, não conservados entre Cqm1 e Aam1, são críticos para a ligação com a toxina Bin. É possível ainda que outras regiões possam estar envolvidas na interação com a toxina Bin;
- b) A proteína Aam1 é expressa no *microvilli* intestinal das larvas de *Aedes aegypti* nas fases larvária e adulta e a refratariedade de *Ae. aegypti* à toxina Bin é decorrente da presença de diferenças entre a proteína Aam1 e o receptor Cqm1. O epitopo encontrado na Cqm1 é altamente divergente na Aam1 e pode ser responsável pela incapacidade de ligação à toxina;
- c) A proteína Aam1 é glicosilada, ao contrário da Cqm1 que não apresenta glicanos, apesar dos sítios preditos. A capacidade de ligação toxina Bin não depende da presença destes carboidratos e ainda não é claro o papel das glicosilações na Aam1, mas é possível que estes glicanos estejam envolvidos em outros processos, tais como atividade catalítica da proteína;
- d) O estudo das proteínas Cqm1 e Aam1 necessita ser conduzido em sistemas de expressão adequados devido às características apresentadas neste trabalho. A expressão em células Sf9 demonstrou que esse sistema apresenta a maquinaria necessária para conferir o processamento adequado das proteínas.

REFERÊNCIAS

AHMED, I. et al. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Reading, v. 57, n. Pt 5, p. 1117-1125, 2007.

ALEXANDER, B; PRIEST, F. G. Numerical classification and identification of *Bacillus sphaericus* including some strains pathogenic for mosquito larvae. Journal of General Microbiology, London, v. 136, n. 2, p. 367-376, 1990.

ALTMANN, F. et al. Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. Glycoconjugate Journal, London, v. 16, p. 109-123, 1999.

BAUMANN, L.; BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4- and 41.9-kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. Journal of Bacteriology, Washington, v. 170, n. 5, p. 2045-2050, 1988.

BAUMANN, P. et al. Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. Journal of Bacteriology, Washington, v. 163, n. 2, p. 738-747, 1985.

BECKER, N. Microbial control of mosquitoes: management of the Upper Rhine mosquito population as a model programme. Parasitology Today, Cambridge, v. 13, n. 12, p. 485-487, 1997.

BLOM, N. et al. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. Proteomics, Weinheim, v. 4, n. 6, p. 1633-1649, 2004.

BOONSERM, P. et al. Association of the components of the binary toxin from *Bacillus sphaericus* in solution and with model lipid bilayers. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, v. 342, n. 4, p. 1273-1278, 2006.

BOQUET, D. et al. Is hydrophobic complementarity involved in antigen-antibody binding? Molecular Immunology, Oxford, v. 32, n. 4, p. 303-308, 1995.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon, Oxford, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 41, n. 7, p. 423-431, 2011.

BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 53, n. 6, p. 1333-1337, 1987.

CANTON, P. E. et al. Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. Peptides, New York, v. 32, n. 3, p. 595-600, 2011.

CHALEGRE, K. D. et al. Novel mutations associated with resistance to *Bacillus sphaericus* in a polymorphic region of the *Culex quinquefasciatus* *cqm1* gene. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 78, n. 17, p. 6321-6326, 2012.

CHANDY, A. et al. A review of neglected tropical diseases: filariasis. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, Singapore, v. 4, n. 7, p. 581-586, 2011.

CHARLES, J. F.; DE BARJAC, H. [pH variations in the midgut of *Aedes aegypti* in relation to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (serotype H14) crystal intoxication]. Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de ses filiales, Paris, v. 74, n. 1, p. 91-95, 1981.

CHARLES, J. F. Ultrastructural midgut events in Culicidae larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spore/crystal complex. Annales de l'Institut Pasteur, Paris, v. 138, n. 4, p. 471-484, 1987.

CHARLES, J. F.; NIELSON-LEROUX, C.; DELECLUSE, A. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 41, p. 451-472, 1996.

CHEN, J. et al. *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. The Biochemical Journal, London, v. 424, n. 2, p. 191-200, 2009a.

CHEN, J. et al. Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 39, n. 10, p. 688-696, 2009b.

CHEN, J. et al. A 104 kDa *Aedes aegypti* aminopeptidase N is a putative receptor for the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 43, n. 12, p. 1201-1208, 2013.

CONSOLI, R. A. G. D.; OLIVEIRA, R. L. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. In: _____. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. 20. ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1994. p. 57-154.

CRICKMORE, N. et al. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 131 n. 3, p. 249-254, 1995.

CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*. Disponível em <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/>. Acesso em: 19 mar. 2014.

DARBOUX, I. et al. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 31, n. 10, p. 981-990, 2001.

DARBOUX, I. et al. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 99, n. 9, p. 5830-5835, 2002.

DARBOUX, I. et al. Transposon-mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Cellular Microbiology, Oxford, v. 9, n. 8, p. 2022-2029, 2007.

DAVIDSON, E. W. Variation in binding of *Bacillus sphaericus* toxin and wheat germ agglutinin to larval midgut cells of six species of mosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology, New York, v. 53, n. 2, p. 251-259, 1989.

DE MELO, J. V. et al. Ultrastructural analysis of midgut cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*. Micron, Oxford, v. 39, n. 8, p. 1342-1350, 2008.

DE MELO, J. V. et al. Cytopathological effects of *Bacillus sphaericus* Cry48Aa/Cry49Aa toxin on binary toxin-susceptible and -resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 75, n. 14, p. 4782-4789, 2009.

DECHKLAR, M. et al. Functional expression in insect cells of glycosylphosphatidylinositol-linked alkaline phosphatase from *Aedes aegypti* larval midgut: a *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptor. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 41, n. 3, p. 159-166, 2011.

DHALIA, R. et al. Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. Molecular and Biochemical Parasitology, Amsterdam, v. 140, n. 1, p. 23-41, 2005.

ELANGOVAN, G. et al. Identification of the functional site in the mosquito larvicidal binary toxin of *Bacillus sphaericus* 1593M by site-directed mutagenesis. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, v. 276, n. 3, p. 1048-1055, 2000.

FERNANDEZ-LUNA, M. T. et al. An alpha-amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp. israelensis Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). Environmental Microbiology, Oxford, v. 12, n. 3, p. 746-757, 2010.

FERNANDEZ, L. E. et al. Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop alpha-8 of domain II. FEBS Letters, Amsterdam, v. 579, n. 17, p. 3508-3514, 2005.

FERNANDEZ, L. E. et al. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. The Biochemical Journal, London, v. 394, n. Pt 1, p. 77-84, 2006.

FERNANDEZ, L. E. et al. Cloning and epitope mapping of Cry11Aa-binding sites in the Cry11Aa-receptor alkaline phosphatase from *Aedes aegypti*. Biochemistry, Moscow, v. 48, n. 37, p. 8899-8907, 2009.

FERRÉ, J. et al. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 132, n., p. 1-7, 1995.

FERREIRA, L. M. Análise da refratariedade do *Aedes aegypti* à toxina binária do biolarvicida *Bacillus sphaericus*. 2009. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

FERREIRA, L. M. et al. The orthologue to the Cpm1/Cqm1 receptor in *Aedes aegypti* is expressed as a midgut GPI-anchored alpha-glucosidase, which does not bind to the insecticidal binary toxin. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 40, n. 8, p. 604-610, 2010.

FERREIRA, L. M. et al. Non conserved residues between Cqm1 and Aam1 mosquito α -glucosidases are critical for the capacity of Cqm1 to bind the Binary (Bin) toxin from *Lysinibacillus sphaericus*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, 2014. (In press).

FIGUEIREDO, L. T. Emergent arboviruses in Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.

FUJII, Y. et al. Affinity maturation of Cry1Aa toxin to the *Bombyx mori* cadherin-like receptor by directed evolution. Molecular Biotechnology, Totowa, v. 54, n. 3, p. 888-899, 2013.

GODSEY, M. S., JR. et al. West Nile virus-infected mosquitoes, Louisiana, 2002. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 11, n. 9, p. 1399-1404, 2005.

GOMEZ, I. et al. Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. The Journal of Biological Chemistry, San Francisco, v. 276, n. 31, p. 28906-28912, 2001.

GOMEZ, I. et al. Hydrophobic complementarity determines interaction of epitope (869)HITDTNNK(876) in *Manduca sexta* Bt-R(1) receptor with loop 2 of domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. The Journal of Biological Chemistry, San Francisco, v. 277, n. 33, p. 30137-30143, 2002.

GOMEZ, I. et al. Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R1 receptor interact with loops alpha-8 and 2 in domain II of Cy1Ab toxin. Biochemistry, Washington, v. 42, n. 35, p. 10482-10489, 2003.

GRIFFITTS, J. S. et al. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. Science, Washington, v. 307, n. 5711, p. 922-925, 2005.

- GRIKO, N. B. et al. Univalent binding of the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* to a conserved structural motif in the cadherin receptor BT-R1. Biochemistry, Washington, v. 46, n. 35, p. 10001-10007, 2007.
- GUO, Q. Y. et al. Single nucleotide deletion of *cqm1* gene results in the development of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus*. Journal of Insect Physiology, Oxford, v. 59, n. 9, p. 967-973, 2013.
- HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 45, n., p. 371-391, 2000.
- HUA, G.; JURAT-FUENTES, J. L.; ADANG, M. J. Bt-R1a extracellular cadherin repeat 12 mediates *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab binding and cytotoxicity. The Journal of Biological Chemistry, San Francisco, v. 279, n. 27, p. 28051-28056, 2004.
- HUA, G. et al. *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. Biochemistry, Washington, v. 47, n. 18, p. 5101-5110, 2008.
- IBRAHIM, M. A.; GRIKO, N. B.; BULLA Jr., L. A.,. Cytotoxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B toxin is mediated by the cadherin receptor BT-R(3) of *Anopheles gambiae*. Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.), Maywood, v. 238, n. 7, p. 755-764, 2013.
- JIMENEZ, A. I. et al. *Aedes aegypti* alkaline phosphatase ALP1 is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 42, n. 9, p. 683-689, 2012.
- JONES, G. W. et al. The Cry48Aa-Cry49Aa binary toxin from *Bacillus sphaericus* exhibits highly restricted target specificity. Environmental Microbiology, Oxford, v. 10, n. 9, p. 2418-2424, 2008.
- JONES, G. W. et al. A new Cry toxin with a unique two-component dependency from *Bacillus sphaericus*. The FASEB Journal, Bethesda, v. 21, n. 14, p. 4112-4120, 2007.
- JURAT-FUENTES, J. L.; ADANG, M. J. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. European Journal of Biochemistry / FEBS, Berlin, v. 271, n. 15, p. 3127-3135, 2004.
- JURAT-FUENTES, J. L. et al. The HevCaLP protein mediates binding specificity of the Cry1A class of *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. Biochemistry, Washington, v. 43, n. 44, p. 14299-14305, 2004.
- KALE, A. et al. Interaction between mosquito-larvicidal *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin components: analysis of complex formation. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 43, n. 11, p. 1045-1054, 2013.
- KALFON, A. et al. Sporulation of *Bacillus sphaericus* 2297: an electron microscope study of crystal-like inclusion biogenesis and toxicity to mosquito larvae. Journal of General Microbiology, London, v. 130, n. 4, p. 893-900, 1984.

- KARCH, S.; CHARLES, J. F. Toxicity, viability and ultrastructure of *Bacillus sphaericus* 2362 spore/crystal complex used in the field. Annales de l'Institut Pasteur, Paris, v. 138, n. 4, p. 485-492, 1987.
- KATANOSAKA, K. et al. N-Linked glycosylation of *Drosophila* rhodopsin occurs exclusively in the amino-terminal domain and functions in rhodopsin maturation. FEBS Letters, Amsterdam, v. 424, p. 149-154, 1998.
- KELLEN, W. R. et al. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology, New York, v. 7, n. 4, p. 442-448, 1965.
- KNIGHT, P. J.; CRICKMORE, N.; ELLAR, D. J. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. Molecular Microbiology, Oxford, v. 11, n. 3, p. 429-436, 1994.
- KNOWLES, B. H.; KNIGHT, P. J.; ELLAR, D. J. N-acetyl galactosamine is part of the receptor in insect gut epithelia that recognizes an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, London, v. 245, n. 1312, p. 31-35, 1991.
- KRAZIKOV, V. V.; KARELOV, D. V.; FIRSOV, L. M. Alpha-glucosidases Biochemistry, Washington, v. 66, n. 3, p. 267-281, 2001.
- KUNTHIC, T. et al. Essential role of tryptophan residues in toxicity of binary toxin from *Bacillus sphaericus*. BMB Reports, Seoul, v. 44, n. 10, p. 674-679, 2011.
- KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. Journal of Molecular Biology, London, v. 157, n. 1, p. 105-132, 1982.
- LACEY, L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 23, n. 2 Suppl, p. 133-163, 2007.
- LIMPANAWAT, S.; PROMDONKOY, B.; BOONSERM, P. The C-terminal domain of BinA is responsible for *Bacillus sphaericus* binary toxin BinA-BinB interaction. Current Microbiology, New York, v. 59, n. 5, p. 509-513, 2009.
- LIU, J. W. et al. New gene from nine *Bacillus sphaericus* strains encoding highly conserved 35.8-kilodalton mosquitocidal toxins. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 62, n. 6, p. 2174-2176, 1996.
- MCNEIL, B. C.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* Cry2Ab is active on *Anopheles* mosquitoes: single D block exchanges reveal critical residues involved in activity. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 325, n. 1, p. 16-21, 2011.
- MITTAL, P. K. Biolarvicides in vector control: challenges and prospects. Journal of Vector Borne Diseases, Delhi, v. 40, n. 1-2, p. 20-32, 2003.
- MONDINI, A. et al. Saint Louis encephalitis virus, Brazil. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 13, n. 1, p. 176-178, 2007.

MUTEBI, J. P. et al. Yellow fever virus infectivity for Bolivian *Aedes aegypti* mosquitoes. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 10, n. 9, p. 1657-1660, 2004.

NENE, V. et al. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. Science, Washington, v. 316, n. 5832, p. 1718-1723, 2007.

NICOLAS, L.; LECROISEY, A.; CHARLES, J. F. Role of the gut proteinases from mosquito larvae in the mechanism of action and the specificity of the *Bacillus sphaericus* toxin. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, v. 36, n. 11, p. 804-807, 1990.

NICOLAS, L. et al. Respective role of the 42- and 51-kDa components of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 106, n. 3, p. 275-280, 1993.

NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J. F. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. European Journal of Biochemistry / FEBS, Berlin, v. 210, n. 2, p. 585-590, 1992.

NIELSEN-LEROUX, C. et al. Resistance in a laboratory population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus* binary toxin is due to a change in the receptor on midgut brush-border membranes. European Journal of Biochemistry / FEBS, Berlin, v. 228, n. 1, p. 206-210, 1995.

NIELSEN-LEROUX, C. et al. Resistance to *Bacillus sphaericus* involves different mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) larvae. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 34, n. 3, p. 321-327, 1997.

NIELSEN-LEROUX, C. et al. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of west Mediterranean countries. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 39, n. 5, p. 729-735, 2002.

OCHOA-CAMPUZANO, C. et al. An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, v. 362, n. 2, p. 437-442, 2007.

OEI, C.; HINDLEY, J.; BERRY, C. Binding of purified *Bacillus sphaericus* binary toxin and its deletion derivatives to *Culex quinquefasciatus* gut: elucidation of functional binding domains. Journal of General Microbiology, London, v. 138, n. 7, p. 1515-1526, 1992.

OPOTA, O. et al. Identification and characterization of the receptor for the *Bacillus sphaericus* binary toxin in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology, Oxford, v. 149, n. 3, p. 419-427, 2008.

OPOTA, O. et al. *Bacillus sphaericus* binary toxin elicits host cell autophagy as a response to intoxication. PLoS One, San Francisco, v. 6, n. 2, p. e14682, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Defeating dengue: a difficult task ahead. Bulletin of the World Health Organization, Geneve, v. 85, n. 10, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Dengue and severe dengue. Geneve, 2013. (Fact sheet, n. 117). Disponível em < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em 20. mar. 2014.

PARDO-LOPEZ, L.; SOBERON, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. FEMS Microbiology Reviews, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 3-22, 2013.

PARTRIDGE, R. M.; BERRY, C. Insecticidal activity of the *Bacillus sphaericus* Mtx1 toxin against *Chironomus riparus*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, v. 79 n., p. 135-136, 2002.

PAUCHET, Y. et al. Effects of a mosquitocidal toxin on a mammalian epithelial cell line expressing its target receptor. Cellular Microbiology, Oxford, v. 7, n. 9, p. 1335-1344, 2005.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Washington, v. 71, n. 2, p. 255-281, 2007.

PORTA, H. et al. Tobacco plants expressing the Cr1AbMod toxin suppress tolerance to Cry1Ab toxin of *Manduca sexta* cadherin-silenced larvae. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 41, p. 523-519, 2011.

REGIS, L. et al. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. Trends in Parasitology, Oxford, v. 17, n. 8, p. 377-380, 2001.

ROMÃO, T. P. et al. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its alpha-glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. The FEBS Journal, Oxford, v. 273, n. 7, p. 1556-1568, 2006.

ROMAO, T. P.; DE-MELO-NETO, O. P.; SILVA-FILHA, M. H. The N-terminal third of the BinB subunit from the *Bacillus sphaericus* binary toxin is sufficient for its interaction with midgut receptors in *Culex quinquefasciatus*. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 321, n. 2, p. 167-174, 2011.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. Nature Protocols, London, v. 5, n. 4, p. 725-738, 2010.

SANITT, P.; PROMDONKOY, B.; BOONSERM, P. Targeted mutagenesis at charged residues in *Bacillus sphaericus* BinA toxin affects mosquito-larvicidal activity. Current Microbiology, New York, v. 57, n. 3, p. 230-234, 2008.

SCHAFFNER, F.; MEDLOCK, J. M.; VAN BORTEL, W. Public health significance of invasive mosquitoes in Europe. Clinical Microbiology and Infection, Oxford, v. 19, n. 8, p. 685-692, 2013.

SEIRIN LEE, S. et al. Modelling *Aedes aegypti* mosquito control via transgenic and sterile insect techniques: endemics and emerging outbreaks. Journal of Theoretical Biology, London, v. 331, p. 78-90, 2013.

- SILVA-FILHA, M. H.; NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J. F. Binding kinetics of *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush-border membranes of *Anopheles* and *Culex* sp. mosquito larvae. European Journal of Biochemistry / FEBS, Berlin, v. 247, n. 3, p. 754-761, 1997.
- SILVA-FILHA, M. H.; NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J. F. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 29, n. 8, p. 711-721, 1999.
- SILVA-FILHA, M. H.; PEIXOTO, C. A. Immunocytochemical localization of the *Bacillus sphaericus* binary toxin components in *Culex quinquefasciatus* midgut. Pesticide Biochemistry and Physiology, San Diego, v. 77, p. 138-146, 2003.
- SILVA-FILHA, M. H. et al. Two *Bacillus sphaericus* binary toxins share the midgut receptor binding site: implications for resistance of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) larvae. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 241, n. 2, p. 185-191, 2004.
- SILVA-FILHA, M. H. N. L. et al. *Culex quinquefasciatus* field populations subjected to treatment with *Bacillus sphaericus* did not display high resistance levels. Biological Control, San Diego, v. 44, p. 227-234, 2008.
- SINGER, S. Isolation and development of bacterial pathogens in vectors. In: _____. Biological regulation of vectors. Bethesda: DHEW publication, 1977. p. 3-18.
- SINGH, G. J.; GILL, S. S. An electron microscope study of the toxic action of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larvae. Journal of Invertebrate Pathology, New York, v. 52, n. 2, p. 237-247, 1988.
- SOBERON, M.; LOPEZ-DIAZ, J. A.; BRAVO, A. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. Peptides, New York, v. 41, p. 87-93, 2013.
- SOUZA-NETO, J. A. et al. Sugar digestion in mosquitoes: identification and characterization of three midgut alpha-glucosidases of the neo-tropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology, New York, v. 147, n. 4, p. 993-1000, 2007.
- SRISUCHARITPANIT, K. et al. Expression and purification of the active soluble form of *Bacillus sphaericus* binary toxin for structural analysis. Protein Expression and Purification, San Diego, v. 82, n. 2, p. 368-372, 2012.
- TAUIL, P. L. Controle de doenças transmitidas por vetores no sistema único de saúde. Informe Epidemiológico do SUS, Brasília, v. 11, n. 2, p. 59-60, 2002.
- TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comparative Biochemistry and Physiology, Oxford, v. 109B, n., p. 1-62, 1994.

THANABALU, T.; PORTER, A. G. Efficient expression of a 100-Kilodalton mosquitocidal toxin in protease-deficient recombinant *Bacillus sphaericus*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 61, n. 11, p. 4031-4036, 1995.

THANABALU, T.; PORTER, A. G. A *Bacillus sphaericus* gene encoding a novel type of mosquitocidal toxin of 31.8 kDa. Gene, Amsterdam, v. 170, n. 1, p. 85-89, 1996.

THIERY, I. et al. Applications de *Bacillus thuringiensis* et de *B. sphaericus* dans la démoustication et la lutte contre les vecteurs de maladies tropicales. Annales de l'Institut Pasteur/Actualités, Paris, v. 7, p. 247-260, 1996.

TOWNSON, H. et al. Exploiting the potential of vector control for disease prevention. Bulletin of the World Health Organization, Geneve, v. 83, n. 12, p. 942-947, 2005.

VADLAMUDI, R. K. et al. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. The Journal of Biological Chemistry, San Francisco, v. 270, n. 10, p. 5490-5494, 1995.

VALAITIS, A. P. et al. Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, New York, v. 46, n. 4, p. 186-200, 2001.

VAN RIE, J. et al. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 56, n. 5, p. 1378-1385, 1990.

VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. Glycobiology, Oxford, v. 3, n. 2, p. 97-130, 1993.

WANG, S., JACOBS-LORENA, M. Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes. Trends in Biotechnology, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 185-193, 2013.

WEI, S., CAI, Q., YUAN, Z. Mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* induces stronger delayed effects than binary toxin on *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 43, n. 4, p. 726-730, 2006.

WEISER, J. A mosquito-virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from northern Nigeria. Zentralblatt für Mikrobiologie, Jena, v. 139, p. 57-60, 1984.

WICKREMESINGHE, R. S. B., MENDIS, C. L. *Bacillus sphaericus* spore from Sri Lanka demonstrating rapid larvicidal activity on *Culex quinquefasciatus*. Mosquito News, Jena, v. 40, p. 387-389, 1980.

WILKE, A. B., MARRELLI, M. T. Genetic control of mosquitoes: population suppression strategies. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, São Paulo, v. 54, n. 5, p. 287-292, 2012.

XIE, R. et al. Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. The Journal of Biological Chemistry, San Francisco, v. 280, n. 9, p. 8416-8425, 2005.

YAMAGUCHI, T., BANDO, H., ASANO, S. Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry8Da toxin-binding glucosidase from the adult Japanese beetle, *Popillia japonica*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, v. 113, n. 2, p. 123-128, 2013.

ZAYED, A. et al. Detection of Chikungunya virus in *Aedes aegypti* during 2011 outbreak in Al Hodayda, Yemen. Acta Tropica, Basel, 2012.

ZHANG, Y. M. et al. Isolation of two high toxic *Bacillus sphaericus* strains. Insecticidal Microorganisms, [S. l.], v. 1, p. 98-99, 1987.

ZHENG, L. et al. Two genes encoding midgut-specific maltase-like polypeptides from *Anopheles gambiae*. Experimental Parasitology, New York, v. 81, n. 3, p. 272-283, 1995.

APÊNDICE A – Artigo publicado em colaboração



Novel Mutations Associated with Resistance to *Bacillus sphaericus* in a Polymorphic Region of the *Culex quinquefasciatus* *cqm1* Gene

Karlos Dlogo de Melo Chalegre,² Tatiany Patricia Romão,² Daniella Aliny Tavares,² Eloina Mendonça Santos,² Ligia Maria Ferreira,² Cláudia Maria Fontes Oliveira,² Osvaldo Pompílio de-Melo-Neto,² and Maria Helena Neves Lobo Silva-Filho²

Department of Entomology¹ and Department of Microbiology,² Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife, PE, Brazil

Bin toxin from *Bacillus sphaericus* acts on *Culex quinquefasciatus* larvae by binding to Cqm1 midgut-bound receptors, and disruption of the *cqm1* gene is the major cause of resistance. The goal of this work was to screen for a laboratory-selected resistance *cqm1*_{BAC} allele in field populations in the city of Recife, Brazil, and to describe other resistance-associated polymorphisms in the *cqm1* gene. The *cqm1*_{BAC} allele was detected in the four nontreated populations surveyed at frequencies from 0.001 to 0.017, and sequence analysis from these samples revealed a novel resistant allele (*cqm1*_{BAC-D16}) displaying a 16-nucleotide (nt) deletion which is distinct from the 19-nt deletion associated with *cqm1*_{BAC}. Yet a third resistant allele (*cqm1*_{BAC-D25}), displaying a 25-nt deletion, was identified in samples from a treated area exposed to *B. sphaericus*. A comparison of the three deletion events revealed that all are located within the same 208-nt region amplified during the screening procedure. They also introduce equivalent frameshifts in the sequence and generate the same premature stop codon, leading to putative transcripts encoding truncated proteins which are unable to locate to the midgut epithelium. The populations analyzed in this study contained a variety of alleles with mutations disrupting the function of the corresponding Bin toxin receptor. Their locations reveal a hot spot that can be exploited to assess the resistance risk through DNA screening.

The utilization of biolarvicides based on *Bacillus sphaericus* requires monitoring strategies which can predict or prevent potential resistance selection among exposed mosquito populations. The binary (Bin) crystal toxin, which is the major active insecticidal factor found in commercial *B. sphaericus* strains, acts on mosquito larvae after ingestion, processing and binding to specific receptors located on the midgut epithelium (5, 24). Bin toxin displays high activity against larvae of the *Culex pipiens* complex and *B. sphaericus* has an excellent persistence under field conditions, which make this an effective biolarvicide for controlling these species in urban areas (17). However, the mode of action of Bin toxin relies entirely on its binding to a single class of midgut receptors which are glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored α -glucosidases named Cqm1 and Cqm1 for *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus*, respectively (7, 29, 30). Failure of toxins to bind to their midgut receptors has been described, in a wide range of target insects, as the primary resistance mechanism to insecticidal proteins from entomopathogenic bacteria (11, 16, 25). In the case of *B. sphaericus*, this is a critical aspect since resistance cases have also been reported after laboratory selection or field exposure (2, 25, 27, 36, 38, 44).

Investigation of the *B. sphaericus* resistance mechanisms has confirmed the essential role for the binding of Bin toxin to its receptors, since mutations within the *cqm1/cqm1* genes, which are recessively inherited, are the major causes leading to the absence of functional receptors in the midgut and consequent high resistance levels (36). Resistance cases unrelated to receptor binding failure were reported; however, the mechanisms involved were not elucidated to date (25). On the other hand, molecular characterization of resistance linked to *cqm1/cqm1* genes, performed in two laboratory-selected colonies and one field population, revealed four distinct alleles associated with this phenotype: *cqm1*_{CEC} and *cqm1*_{BAC}, laboratory-selected alleles in California (GEO colony) and in Recife, Brazil (CqRL1/2362 colony), respectively, and *cqm1*_{BP} and *cqm1*_{BP-def}, both character-

ized in a field population from the south of France (6, 8, 29). Each allele displays distinct resistance-associated mutations which result in potential transcripts for truncated soluble proteins lacking the GPI anchor (*cqm1*_{CEC}, *cqm1*_{BAC}, *cqm1*_{BP}) or for truncated GPI-anchored proteins which are still unable to bind Bin toxin due to the loss of 66 amino acids (*cqm1*_{BP-def}). The CqRL1/2362 colony, derived from eggs collected in the Recife Metropolitan Area (RMA; Brazil) and laboratory selected, displays high levels of resistance (resistance ratio [RR], >100,000) due to the failure of Bin toxin binding to microvillus receptors, and larvae from this colony were found to be homozygous for the *cqm1*_{BAC} allele (26, 27). Characterization of this allele showed a 19-nucleotide (nt) deletion which changes the frame of the protein coding sequence and originates a premature stop codon. The resulting predicted protein coded by this allele lacks part of its C-terminal end, including the GPI-anchor site. As a consequence, in individuals found to be homozygous for the *cqm1*_{BAC} allele, no functional polypeptide is present as a midgut membrane-bound receptor, a condition essential for Bin toxin binding (29). The characterization of this mutation allowed the development of a PCR amplification assay, which upon screening for *cqm1*_{BAC} in larva samples from RMA field populations, showed the presence of the associated deletion in a frequency on the order of 10^{-3} and 10^{-2} in nontreated and treated areas, respectively (4).

Utilization of *B. sphaericus* biolarvicides in RMA has been an

Received 13 April 2012; Accepted 25 June 2012

Published ahead of print 5 July 2012

Address correspondence to Maria Helena Neves Lobo Silva-Filho, mhneves@cpqar.fiocruz.br

Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.01190-12

ANEXO A - Considerações Éticas

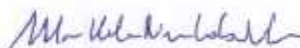


Ministério da Saúde

À Coordenação do Doutorado em Saúde Pública-CPqAM

Declaro para os devidos fins que o projeto de pesquisa de doutorado intitulado "**Modo de ação do biolarvicida *Lysinibacillus sphaericus*: identificação do epítipo da toxina Binária no receptor Cqm1 e base molecular da seletividade**" desenvolvido pela aluna Lígia Maria Ferreira (turma 2010-2014), não envolve procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96 e complementares.

Recife, 05 de dezembro de 2013.



Maria Helena Neves Lobo Silva Filha
Orientadora

Departamento de Entomologia
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ

Maria Helena Neves Lobo Silva Filha
Pesquisadora, Depto. de Entomologia
CPQAM - FIOCRUZ
Identidade SIAPE: 1218430