

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**MODELAGEM MOLECULAR DAS  $\delta$ -ENDOTOXINAS DO**  
*BACILLUS THURINGIENSIS*

Wagner Alexandre Lucena

Porto Alegre – Brasil

Novembro de 2012

# MODELAGEM MOLECULAR DAS $\delta$ -ENDOTOXINAS DO *BACILLUS THURINGIENSIS*

*Wagner Alexandre Lucena*

Tese de doutorado elaborada nos Laboratório da Interação Molecular Planta/Praga do CENARGEN e Laboratório de Bioinformática Estrutural do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob a orientação da Professora **Maria Fátima Grossi de Sá** e a co-orientação do Professor **Hugo Verli**.

Porto Alegre – Brasil

Novembro de 2012

# MODELAGEM MOLECULAR DAS $\delta$ -ENDOTOXINAS DO *BACILLUS THURINGIENSIS*

*Wagner Alexandre Lucena*

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

## Banca Examinadora:

---

Maria Fátima Grossi de Sá (Embrapa CENARGEN) (Presidente)

---

Thereza Amélia Soares (Departamento de Química Fundamental - UFPE)

---

Maria Helena Bodanese Zanettini (Departamento de Genética - UFRGS)

---

Charley Chistian Staats (Centro de Biotecnologia - UFRGS)

---

Fernanda Staniçuaski (Centro de Biotecnologia – UFRGS) (Suplente)

Esta tese foi realizada sob a orientação da professora Doutora Maria Fátima Grossi de Sá e co-orientação do professor Doutor Hugo Verli, com o apoio financeiro da Embrapa, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular, junto ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**FICHA CATALOGRÁFICA**

LUCENA, Wagner Alexandre.

**Modelagem Molecular das  $\delta$ -endotoxinas do *Bacillus thuringiensis***

Rio Grande do Sul, UFRGS, Centro de Biotecnologia, 2012.

Tese: Doutor em Ciências (Biologia Celular e Molecular)

- |                       |                                  |
|-----------------------|----------------------------------|
| 1. Dinâmica Molecular | 2. <i>Bacillus thuringiensis</i> |
| 3. Delta-Endotoxinas  | 4. Controle de Pragas            |

I. Maria Fatima Grossi de Sá

II. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Centro de Biotecnologia

III. Títulos

## AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, pela oportunidade de aprimoramento profissional e propiciar condições para que eu sirva melhor o povo brasileiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pela oportunidade de realizar este trabalho.

À CAPES e CNPq que financiaram parte deste projeto.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite.

Meus sinceros agradecimentos aos Professores Fátima e Hugo, pelo apoio e pela participação fundamentais nesta etapa da minha formação profissional.

À Sílvia e ao Luciano, pela competência exemplar, presteza e humor inabalável.

Aos colegas do Grupo de Bioinformática Estrutural que me acolheram no início deste projeto, por todas as dúvidas solucionadas, troca de conhecimento, aprendizado técnico e sobre a vida enfim.

Ao Laércio Pol Fachin e Guilherme Menegon Giesel, por estarem sempre a postos.

Ao Rodrigo Ligabue Braun, que mais do que colega se tornou um amigo.

À colega Nair Helena Castro Arriel, pela sabedoria, cosmovisão humanista e compreensão da importância de cada indivíduo nos contextos profissionais e pessoais. E pelo Óleo de Andiroba.

À Claudia Fernandes pela participação em todos os momentos do meu doutorado. E mais ainda, pela troca de experiências, por ter aberto uma parte de sua mente para mim e olhado a minha também sem assombros. Por ter tornado-se uma amiga inesquecível, daqueles que os anos que por ventura se interpõem, tornam-se minutos após cada reencontro.

Aos meus pais José da Silva Lucena e Antonia Izabel Lucena e irmã Waldilene Nadja, pelo suporte familiar tão importante pra manter o equilíbrio nos momentos difíceis.

Aos meus sobrinhos Diego e Ícaro Lucena, pela graça e leveza com que mostram a beleza e o poder da vida.

Aos meus filhos, Victória e Gregório Lucena, luzes que povoam meu coração e meus sorrisos.

"...Naquele tempo, o mundo dos espelhos e o mundo dos homens não estavam, como agora, incomunicáveis. Eram, além disso, muito diferentes; não coincidiam nem os seres nem as cores nem as formas. Ambos os reinos, o especular e o humano, viviam em paz; entrava-se e saía-se pelos espelhos. Uma noite, a gente do espelho invadiu a Terra. Sua força era grande, porém ao cabo de sangrentas batalhas as artes mágicas do Imperador Amarelo prevaleceram. Este rechaçou os invasores, encarcerou-os nos espelhos e lhes impôs a tarefa de repetir, como numa espécie de sonho, todos os atos dos homens. Privou-os de sua força e de sua figura e reduziu-os a meros reflexos servis. Um dia, entretanto, livrar-se-ão dessa mágica letargia.

O primeiro a despertar será o Peixe. No fundo do espelho, perceberemos uma linha muito tênue e a cor dessa linha não parecerá com nenhuma outra. Depois, irão despertando as outras formas. Aos poucos diferirão de nós, aos poucos deixarão de nos imitar. Romperão as barreiras de vidro ou de metal e desta vez não serão vencidas. Junto às criaturas dos espelhos combaterão as criaturas da água..."

Jorge Luis Borges (1899-1986)



LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE TABELAS.....	16
1. Introdução.....	17
1.1. O <i>Bacillus thuringiensis</i> como agente de controle microbiano.....	17
1.2. As delta-endotoxinas como principal componente do sucesso do Bt.....	18
1.3. As 3D-Cry ativadas apresentam uma estrutura globular.....	20
1.4. A especificidade do Bt é resultado de interações específicas entre as 3D-Cry e a membrana dos insetos-alvo.....	23
1.5. As caderinas são receptores transmembrana para as toxinas 3D-Cry.....	25
1.6. Receptores ligados à membrana por âncoras do tipo glicofosfatidilinositol (GPI)......	28
1.6.1. As aminopeptidases N.....	28
1.6.2. Fosfatases alcalinas.....	31
1.7. As toxinas 3D-Cry interagem de forma específica com outros ligantes.....	32
1.8. O modo de ação das 3D-Cry e suas controvérsias.....	32
1.8.1. O modelo de formação de poros em duas décadas de estudos.....	32
1.8.2. O modelo de transdução de sinal.....	36
1.9. Toxinas 3D-Cry produzidas pela EMBRAPA.....	37
1.9.1. Algodão e Cana-de-Açúcar: demandas nacionais.....	37
1.9.2. Toxinas Cry8Ka e Cry1Ia12.....	38
1.10. Modelagem Molecular de Proteínas.....	39
2. Objetivos.....	43
2.1. Objetivo Geral.....	43
2.2. Objetivos específicos.....	43
3. Metodologia.....	44
3.1. Programas utilizados.....	44
3.2. Proteínas modeladas.....	44
3.3. Sistemas simulados.....	46
3.4. Simulações de DM.....	47
3.5. Cálculos de <i>docking</i> molecular.....	48

4.	Resultados .....	49
4.1.	Análise das mutações das Cry8Ka e Cry1Ia12 .....	49
4.1.1.	Cry8Ka5.....	49
4.1.2.	Cry1Ia12.....	51
4.2.	Dinâmica Molecular das Cry1Aa, Cry1Ac, Cry3Aa e Cry8Ea1.....	54
4.3.	<i>Docking</i> molecular .....	60
5.	Discussão .....	62
5.1.	Análise das mutações das Cry8Ka e Cry1Ia12 .....	62
5.1.1.	Cry8Ka5.....	62
5.1.2.	Cry1Ia12.....	65
5.2.	Dinâmica Molecular das Cry1Aa, Cry1Ac, Cry3Aa e Cry8Ea1.....	66
6.	Conclusões.....	69
7.	Manuscrito a ser submetido à BMC Structural Biology .....	70
8.	Perspectivas.....	85
9.	Referências Bibliográficas.....	86
10.	Anexo I.....	94
11.	Anexo II.....	96
12.	Anexo III.....	99
13.	Anexo IV.....	106

## LISTA DE ABREVIATURAS

Bt - *Bacillus thuringiensis*

Mtx - *mosquitocidal Cry toxins*

Bin - *binary toxin*

Cyt - *cytolytic*

3D-Cry - *three domain crystal*

PDB - *Protein Data Base*

Gal-NAc - *N-acetilgalactosamina*

BBMV - *brush border membrane vesicles*

CAD - *caderina*

APN - *aminopeptidase N*

ALP - *fosfatase alcalina*

ADAM - *a disintegrin and metalloproteinase*

CR – *cadherin repeat*

NCBI - *National Center of Biotechnological Information*

GPI - *glicofosfatidilinositol*

PI-PLC - *phosphatidylinositol-specific phospholipase C*

GST - *glutathione-S-transferase*

DM - *dinâmica molecular*

SPC - *Single Point Charge*

PME - *Particle-Mesh Ewald*

---

## RESUMO

*Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria Gram-positiva entomotóxica usada no controle de insetos-praga e vetores de doenças há mais de 60 anos. Desde a introdução das plantas cultivadas expressando genes de Bt, ficou demonstrado que cultivares-Bt constituem uma importante ferramenta no aumento da produtividade e diminuição no uso de pesticidas químicos. O sucesso do Bt advém da produção das  $\delta$ -endotoxinas (Cry). Estas toxinas compartilham um mecanismo de ação semelhante, com pelo menos, alguns aspectos em comum. A atividade das Cry é baseada nas clivagens N e C-terminais, ligação a receptores (*i.e.* caderinas) e mudanças conformacionais. O objetivo deste trabalho foi estudar aspectos estruturais das  $\delta$ -endotoxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry3Aa, Cry8Ea1, Cry8Ka1, Cry8Ka5 e Cry1Ia12 usando ferramentas de modelagem molecular por homologia, dinâmica molecular (DM) e *docking* molecular. Oito toxinas Cry e duas caderinas (CAD) foram modeladas. Quatro toxinas (Cry1Aa, Cry1Ac, Cry3Aa e Cry8Ea1) foram usadas para construir 8 sistemas que foram submetidos a simulações de DM de 50 ns utilizando o pacote GROMACS e o campo de força GROMOS96 43a1. As Cry8Ka1, Cry8Ka5, Cry1Ia12 e suas 3 variantes foram comparadas a fim de estabelecer as relações entre as diferenças estruturais e as mudanças na toxicidade. As caderinas, Cry1Ab e Cry1Ac foram usadas nos cálculos de *docking* molecular. Os resíduos das Cry1A com RMSF alto são os mesmos identificados experimentalmente como sítios de reconhecimento/ligação aos receptores ou desempenham um papel na dinâmica de interação. Os dados mostraram que as flexibilidades global e local das Cry estudadas aumentaram nos sistemas sem a  $\alpha$ -1 e isto pode estar relacionado com o mecanismo de ação. Este efeito se propaga por toda a superfície a não apenas na porção N-terminal, sugerindo o início de um processo de transição conformacional. Na Cry1Ac, a ausência da  $\alpha$ -1 promove alterações estruturais na alça 2 (ligação a receptores GPI). Algumas mutações das Cry8Ka e Cry1Ia12 estão próximas dos sítios de ligação e podem estar contribuindo para as alterações nas toxicidades. Os mapas de interfaces resultantes dos *dockings* moleculares corresponderam aos dados experimentais. Neste trabalho foi possível observar novos aspectos do mecanismo de ação das toxinas Cry e suas interações com caderinas.

## ABSTRACT

*Bacillus thuringiensis* (Bt) is a Gram-positive entomotoxic bacterium widely used to control crop pests and disease vectors. Since the introduction of transgenic plants expressing Bt genes, it has been demonstrated that Bt-crops constitute an important tool in the increase of productivity and in the decrease of the use of chemical pesticides. Its success comes from the production of the  $\delta$ -endotoxins (Cry). These toxins share a molecular mechanism of similar action or, at least, some common aspects. Activity of Cry proteins is due to N- or C-terminal cleavages, binding to at least one membrane receptor (e.g. cadherins) and conformational changes. The aim of this work was to study structural aspects of Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry3Aa, Cry8Ea1, Cry8Ka1, Cry8Ka5 and Cry1Ia12  $\delta$ -endotoxins, using homology modeling, molecular dynamics (MD) and molecular docking. Eight Cry toxins and two cadherins (CAD) were modeled. Four toxins (Cry1Aa, Cry1Ac, Cry3Aa and Cry8Ea1) were used to construct eight systems (whole Cry toxins and  $\alpha$ -1 removed proteins ( $\Delta\alpha$ 1)). Cry8Ka1, Cry8Ka5, Cry1Ia12 and their three variants were compared to analyze the contributions of each mutation. The cadherins and Cry1Ab and Cry1Ac were used on docking calculations. The Cry1A residues with high flexibility are the same identified as recognition/binding sites (apex of domain II and domain-II/III interface) or to play a role on its dynamic. The data show that the global and local flexibilities of Cry toxins studied was increased by helix  $\alpha$ -1 withdrawal ( $\Delta\alpha$ 1) and it is closely related with the mode of action. This effect propagates on the surface and not only on the N-termini suggesting a complex process of conformational transition. Regarding Cry1Ac, the absence of helix  $\alpha$ -1 triggers structural changes on loop2, which is related to binding GPI-receptors. Some Cry8Ka5 and Cry1Ia12 mutations are in the neighborhood of receptor-binding sites and this fact may imply alterations on binding affinity. It was possible to obtain a map of Cry/CAD interface by docking studies. Therefore, this work was able to obtain molecular level insights into the Cry activation mechanism and its interaction with CAD.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Eletromicrografia de células do <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> (Bti) durante a esporulação e formação da inclusão cristalina	17
Figura 2: Representação esquemática da estrutura tridimensional das toxinas 3D-Cry	21
Figura 3: Representação esquemática da estrutura terciária da Cry1Ac mostrando os cinco blocos conservados	23
Figura 4: Esquema mostrando a estrutura dos domínios de e-caderinas ligantes de toxinas 3D-Cry	26
Figura 5: Representação da estrutura terciária teórica de uma APN de <i>Manduca sexta</i>	28
Figura 6: Esquema mostrando as etapas do mecanismo de ação das 3D-Cry de acordo com o modelo de formação de poros	34
Figura 7: Representação esquemática das estruturas simuladas.	47
Figura-8 Gráfico de Ramachandran das Cry8Ka modeladas	49
Figura 9: Representação esquemática da estrutura tridimensional da Cry8Ka5	50
Figura 10: Representação esquemática do potencial eletrostático de superfície (PES) local nas regiões modificadas das Cry8Ka	51
Figura-11 Gráfico de Ramachandran das Cry11a12 modeladas	52
Figura 12: Estrutura terciária teórica da Cry11a12 e as mutações das variantes	52
Figura-13: Representação esquemática da mutação E639G	53
Figura 14: Representação esquemática da mutação D233N da variante 2	54

Figura 15: Desvio Quadrático Médio – RMSD das Cry toxinas estudadas	55
Figura 16: Raio de Giro – Rg das Cry toxinas Cry1Aa, Cry1Ac, Cry3Aa e Cry8Ea1	55
Figura 17: Flutuação Média Quadrática – RMSF das toxinas Cry	56
Figura 18: Função de Distribuição Radial das regiões ligantes das Cry1Aa e Cry1Ac	59
Figura 19: Função de Distribuição Radial de átomos de Oxigênio e Nitrogênio da alça 2 das Cry1Aa e Cry1Ac	60
Figura 20: Caderinas de <i>Helicoverpa armigera</i> – CAD-Ha (em magenta) e <i>Manduca sexta</i> – CAD-Ms (em laranja)	61
Figura 21: Representação esquemática da estrutura heterodimérica formada pelas CAD-Ms e Cry1Ab	61
Figura 22: Detalhe do domínio III mostrando as distâncias entre o resíduo D520 e os resíduos da mutação: K538 e E538	63

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Toxinas 3D-Cry e receptores ou moléculas ligantes foram identificados nas espécies-alvo de maior expressão da toxicidade	25
Tabela 2: Toxinas 3D-Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> e Caderinas que foram modeladas por homologia	45
Tabela 3: Toxinas variantes da Cry1Ia12, mutações e mortalidade aferida para <i>T. licus licus</i> .	46



## 1. Introdução

### 1.1. O *Bacillus thuringiensis* como agente de controle microbiano

O uso intenso e prolongado de inseticidas químicos para o controle de insetos-praga e vetores de doenças provocou ao longo dos anos, o surgimento de populações resistentes a tais agentes, bem como danos à saúde humana e ambiental. Alternativamente, os agentes microbianos de controle começaram a ser utilizados com sucesso, e entre estes, uma bactéria, o *Bacillus thuringiensis* (Bt) mostrou ser bastante eficaz.

O Bt é uma bactéria da família Bacillaceae, pertencente ao grupo do *Bacillus cereus*, Gram-positiva, esporulante, cosmopolita, presente em amostras de solo, filoplano, e trato digestivo de Arthropoda e outros invertebrados superiores (Hannay e Fitz-James 1955; Adams e Hartman 1965; de Barjac e Bonnefoi 1968; Rogoff e Yousten 1969; Wei, Hale et al. 2003). O Bt se distingue das demais espécies do seu grupo por produzir, durante a segunda fase da esporulação, inclusões cristalinas contendo proteínas de ação entomotóxica (Schnepf, Crickmore et al. 1998) (Figura 1).

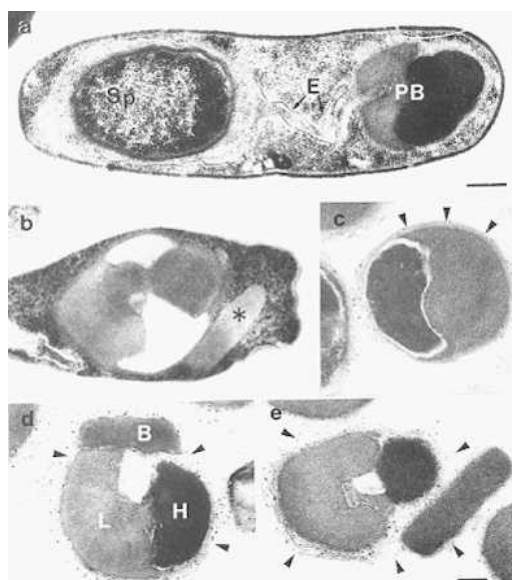


Figura 1: Eletromicrografia de células do *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) durante a esporulação e formação da inclusão cristalina. a: Célula bacteriana na primeira fase da esporulação mostrando o esporo (Sp), exospório (E) e inclusão (PB). b-e: Formação da inclusão proteica contendo as toxinas Cry11Aa (\*), Cry4Aa e Cry4Ba (H) e CytAa (L). Fonte: (Lacey 2007)

O Bt foi isolado em 1901 no Japão, por Ishiwata e anos após, reisolado na Thuringia, causando epizootia em larvas de *Bombyx mori* (Fast e Angus 1965). Posteriormente, outras cepas de Bt foram isoladas a partir de insetos moribundos coletados em campo, e finalmente, o seu potencial para controle de espécies nocivas foi reconhecido (Heimpel 1967; Yamvrias e Angus 1969; Larson e Ignoffo 1971; Gingrich, Allan et al. 1974; Lewis, Dubois et al. 1974). Desde então, o Bt começou a ser usado com muito sucesso para o controle de insetos-praga da agricultura e vetores de doenças, devido, principalmente, à sua especificidade, que reflete diretamente na sua segurança para a saúde humana e dos organismos não-alvo. Neste contexto, vários programas de controle em massa utilizaram o Bt, em biolarvicidas com diversas formulações, como uma alternativa bem sucedida ao uso de pesticidas químicos (Araujo-Coutinho e Lacey 1990; Navon, Klein et al. 1990; Betz, Hammond et al. 2000; Van Rie 2000; Kumar, Chandra et al. 2008).

A patologia ocasionada pelo Bt é provocada pela quebra do equilíbrio osmótico das células apicais do epitélio intestinal, ruptura desta membrana e interrupção da alimentação. No caso da ingestão de esporos e inclusões cristalinas, este processo culmina na septicemia ocasionada pela germinação dos esporos de Bt e pela proliferação de outros microorganismos oportunistas, com a consequente morte da larva (Raymond, Johnston et al. 2010). Quando o controle da espécie-alvo ocorre pela ingestão de tecidos vegetais de plantas geneticamente modificadas expressando as toxinas do Bt, a subnutrição leva ao comprometimento do desenvolvimento pós-embrionário, crescimento, fertilidade e fecundidade, provocando a morte dos insetos ou impedindo a manutenção dos altos níveis populacionais em campo (Barton, Whiteley et al. 1987; Tian, Qin et al. 1991).

## 1.2. As delta-endotoxinas como principal componente do sucesso do Bt

A expressão máxima da toxicidade atribuída ao Bt advém principalmente da ação de um grupo de proteínas denominadas delta-endotoxinas, distribuídas em

quatro grandes grupos filogeneticamente relacionados: as Mtx (*mosquitocidal Cry toxins*), Bin (*binary toxin*), Cyt (*cytolytic*) e as 3D-Cry (*three domain crystal*) que se subdividem em 67 subgrupos contendo mais de 500 sequências nucleotídicas (de Maagd, Bravo et al. 2001; Bravo, Likitvivatanavong et al. 2011). Estas proteínas são codificadas por genes plasmidiais que estão associados a elementos de transposição, os quais facilitam a amplificação, transferência horizontal e aumento da variabilidade genética (Lereclus, Lecadet et al. 1982; Schnepf, Wong et al. 1987; Berry, O'Neil et al. 2002). A combinação dos diferentes genes através da conjugação bacteriana resulta na grande diversidade de cepas encontradas em ambientes naturais (Chapman e Carlton 1985; Vilas-Boas, Vilas-Boas et al. 2000; Thomas, Morgan et al. 2001). Entretanto, cada uma das mais de 200 toxinas já catalogadas tem a sua toxicidade restrita a uma única espécie-alvo ou a um pequeno grupo de espécies. Além disso, estas proteínas apresentam uma variação de 20 a 90% na identidade de aminoácidos (Devine e Furlong 2007; Pigott e Ellar 2007; Bravo, Gomez et al. 2012).

As toxinas Mtx, Bin e Cyt tem ação mais restrita aos Diptera e alguns Coleoptera (Hofte e Whiteley 1989; Herman, Scherer et al. 2002). Enquanto que a subfamília 3D-Cry apresenta um largo espectro de ação, sendo tóxica principalmente, contra Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera e até mesmo Nematoda (Wei, Hale et al. 2003). Estas proteínas 3D-Cry dividem-se ainda em dois outros subgrupos de acordo com o peso molecular: as toxinas de 65 e 130 kDa. Esta diferença resulta basicamente, na presença de uma sequência envolvida na formação da inclusão cristalina, situada na metade C-terminal das proteínas de 130 kDa e não tem relação direta com a toxicidade (Bourgouin, Klier et al. 1986; Dammak, Tounsi et al. 2010).

Todas as toxinas 3D-Cry, ou também chamadas toxinas Bt ou simplesmente toxinas Cry, são produzidas na forma inativa e, portanto, denominadas de protoxinas. Após a ingestão pela larva susceptível, as inclusões cristalinas são solubilizadas no pH alcalino do intestino dos insetos e as protoxinas são clivadas pela ação de tripsinas e quimiotripsinas do mesêntero. Esta clivagem ocorre em dois sítios, um localizado na extremidade N-terminal e outro localizado cerca de 700 aminoácidos adiante, e libera um fragmento de cerca de 600 resíduos de aminoácidos localizado na metade N-terminal, o qual é resistente à ação das

proteases intestinais e considerado a toxina ativa (Herrnstadt, Gilroy et al. 1987; Kumar e Venkateswerlu 1998).

### 1.3. As 3D-Cry ativadas apresentam uma estrutura globular

Após a clivagem proteolítica, as toxinas ativas apresentam uma estrutura globular. A primeira estrutura tridimensional obtida por cristalografia foi descrita para a Cry3Aa (código de acesso ao *Protein Data Base* - PDB 1DLC) (Li, Carroll et al. 1991), enquanto que a descrição mais precisa desta estrutura, que é comum a todas as 3D-Cry, foi publicada para a Cry8Ea1 (PDB 3EB7) (Guo, Ye et al. 2009). Até o presente momento, outras oito toxinas, todas na forma ativa, tiveram sua estrutura tridimensional descrita por cristalografia ou modelagem molecular: Cry1Aa (PDB ID: 1CIY) (Grochulski, Masson et al. 1995), Cry1Ab19 (Kashyap, Singh et al. 2012), Cry1Ac (Derbyshire, Ellar et al. 2001), Cry2Aa (PDB ID: 1I5P) (Morse, Yamamoto et al. 2001), Cry3Ba (PDB ID: 1JI6) (Galitsky, Cody et al. 2001), Cry4Aa (PDB ID: 2C9K) (Boonserm, Mo et al. 2006), Cry4Ba (PDB ID: 1W99) (Boonserm, Davis et al. 2005), Cry5Aa (Xin-Min, Li-Qiu et al. 2009).

As toxinas ativas são constituídas por três domínios distintos, contínuos e contíguos (Figura 2). O domínio um (I) é formado por um feixe com até seis  $\alpha$ -hélices antiparalelas de composição anfipática circundando uma única hélice central hidrofóbica (Li, Carroll et al. 1991). As hélices periféricas têm resíduos de aminoácidos polares expostos ao solvente e resíduos hidrofóbicos, notadamente aromáticos, voltados para a hélice central e para o cerne do domínio. O espaço inter-hélices é preenchido com pontes de hidrogênio e/ou pontes salinas formadas entre os grupamentos polares dos aminoácidos. As hélices têm cerca de 30 Å de comprimento e apresentam uma estrutura semelhante ao domínio de proteínas com atividade formadora de poros transmembrana (Pigott e Ellar 2007).

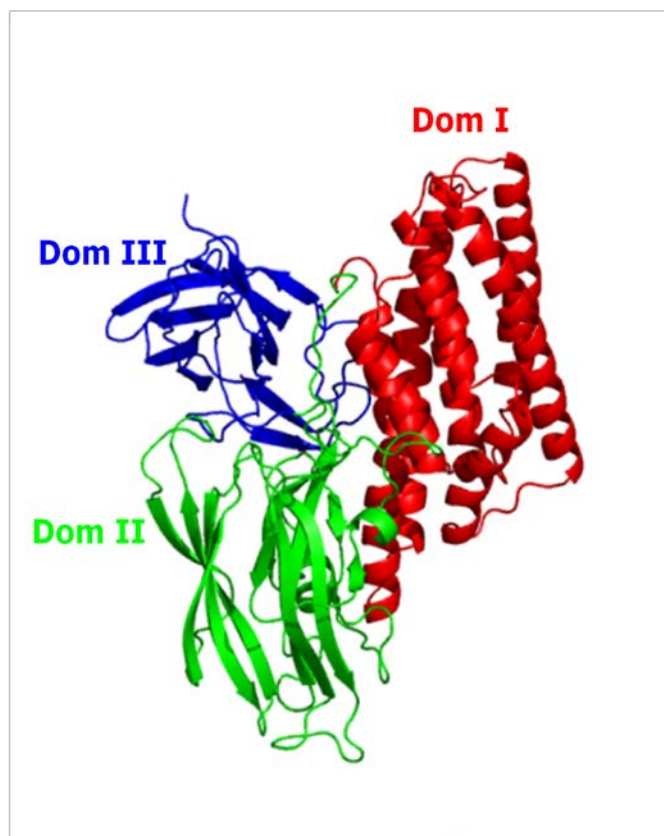


Figura 2: Representação esquemática da estrutura tridimensional das toxinas 3D-Cry mostrando aspectos da estrutura secundária dos três domínios. Domínios I, II e III em vermelho, verde e azul, respectivamente.

O domínio dois (II) é formado por três folhas  $\beta$  antiparalelas que compõem um prisma  $\beta$ . Duas destas folhas- $\beta$  estão voltadas para o solvente e apresentam uma estrutura do tipo chave-grega, onde cada folha é composta por quatro fitas  $\beta$ . A terceira folha- $\beta$  possui três fitas antiparalelas em disposição do tipo chave-grega e uma  $\alpha$ -hélice curta, composta com cerca de oito aminoácidos, denominada  $\alpha$ -hélice oito (Guo, Ye et al. 2009). O domínio II apresenta a maior variabilidade entre as toxinas e esta variação, no que se refere à conformação tridimensional, comprimento, estrutura e sequência, está concentrada, sobretudo nas alças que formam a extremidade deste domínio e nas alças das interfaces com os outros dois domínios (Hofte e Whiteley 1989). Esta diversidade está estreitamente relacionada com a alta especificidade destas toxinas (Hofte e Whiteley 1989; Haider e Mahmood 1990).

O domínio três (III) é composto por um sanduíche- $\beta$  de duas folhas- $\beta$  antiparalelas do tipo rocambole (*jelly roll*). Estas folhas são, por sua vez, formadas

por cinco fitas  $\beta$ , com uma folha voltada para o solvente e a outra voltada para o centro de massa da toxina, na interface tríplice dos três domínios (Pigott e Ellar 2007). Este terceiro domínio apresenta a menor variação estrutural, contudo, similarmente ao domínio II, a sua pouca variabilidade está localizada no comprimento, conformação e orientação das alças. Este domínio apresenta uma estrutura semelhante aos domínios de proteínas que se ligam a carboidratos, com os sítios de ligação localizados em duas fendas situadas no centro de cada folha- $\beta$  (de Maagd, Bravo et al. 2003). De fato, as três toxinas do subgrupo Cry1A, as quais são usadas como toxinas-modelo para estudos da atividade Lepidoptera-específica, compartilham mais de 90% de identidade na sequência de aminoácidos (Bravo 1997). A Cry1Ac difere das outras duas (Cry1Aa e Cry1Ab) por possuir um sítio de ligação ao N-acetilgalactosamina (Gal-NAc) com participação no mecanismo de ação (Derbyshire, Ellar et al. 2001).

Compondo ainda a estrutura comum para todas as toxinas 3D-Cry existem cinco blocos de aminoácidos distribuídos ao longo da cadeia polipeptídica das toxinas ativadas cuja sequência é bastante conservada entre os diversos subgrupos (Figura 3). Nem todas as toxinas possuem os cinco blocos, mas uma vez presente, é possível observar uma alta porcentagem de resíduos de aminoácidos idênticos ou similares. Estes blocos estão localizados nas regiões conectivas entre os domínios ou nas interfaces entre estes e são responsáveis pela manutenção da estrutura globular das toxinas (Hofte e Whiteley 1989; Schnepf, Crickmore et al. 1998).

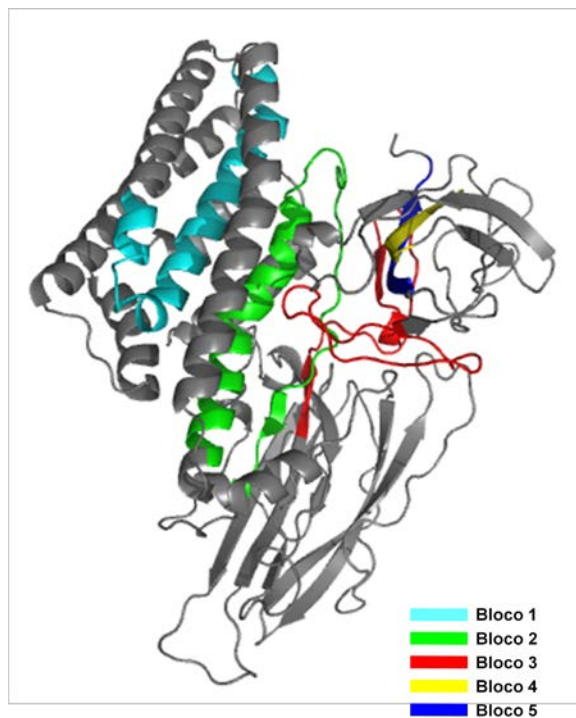


Figura 3: Representação esquemática da estrutura terciária da Cry1Ac mostrando os cinco blocos conservados.

#### 1.4. A especificidade do Bt é resultado de interações específicas entre as 3D-Cry e proteínas de membrana dos insetos-alvo

Vários grupos de pesquisa têm concentrado esforços durante as últimas três décadas para elucidar aspectos relativos ao mecanismo de ação das delta-endotoxinas no nível molecular, desde a contribuição efetiva de cada domínio ou motivo das toxinas até os eventos conformacionais e interações destas com a membrana intestinal, que ocorrem desde a ativação da protoxina até a morte celular. O resultado deste esforço é uma vasta produção bibliográfica que versa sobre o tema com muitas evidências experimentais, obtidas através de diversas metodologias. Todavia, é importante observar que parte dos dados disponíveis na literatura está fora de sincronia, muitas vezes difícil de serem comparados e não são conclusivos. Apesar disso, é possível encontrar compilações que fornecem uma visão geral dos mecanismos propostos para explicar o modo de ação e também a interação das toxinas com moléculas dos insetos-alvo (van Frankenhuyzen 2009;

Bravo, Likitvivatanavong et al. 2011; Pardo-Lopez, Soberon et al. 2012; Vachon, Laprade et al. 2012).

Apesar de compor uma família de toxinas diversa e numerosa, as 3D-Cry desencadeiam um quadro citopatológico comum (Knaak, Franz et al. 2010) e compartilham uma estrutura terciária bastante similar, quando na forma ativa. Estes fatos sugerem que também de forma semelhante, as delta-endotoxinas 3D-Cry apresentam um mecanismo de ação com pelo menos algumas etapas em comum, quando comparadas no nível molecular.

Embora sejam conhecidos 67 grupos de 3D-Cry (Crickmore, Zeigler et al., 2012), as toxinas do grupo Cry1A são as mais estudadas quanto às interações com a membrana e as etapas do mecanismo de ação. Os modelos publicados até o presente momento que se propõem a explicar o modo de ação das delta-endotoxinas 3D-Cry baseiam-se na ligação específica e de alta afinidade, da toxina ativada na forma monomérica, à membrana apical do epitélio intestinal (BBMV - *brush border membrane vesicles*) dos insetos-alvo (Van Rie, Jansens et al. 1990; Pigott e Ellar 2007). Esta etapa de reconhecimento e ligação à membrana é considerada primordial para a especificidade de uma determinada cepa ou toxina e seu espectro de espécies-alvo.

Os ensaios de ligação e competição, homóloga e heteróloga, têm sido usados para demonstrar que as toxinas ativadas têm uma alta afinidade de ligação às BBMVs dos insetos-alvo (Van Rie, Jansens et al. 1989; Wolfersberger 1990; Garczynski, Crim et al. 1991). Adicionalmente, a presença de um padrão de ligação irreversível às BBMVs tem uma relação direta com a expressão maior da toxicidade (Liang, Patel et al. 1995).

Esta ligação estável à membrana sugere a existência de uma interação específica com um receptor de membrana. De fato, os estudos posteriores comprovaram a presença de diferentes classes de proteínas de membrana com participação efetiva no mecanismo de ação. Atualmente, são conhecidos como receptores ou ligantes das toxinas 3D-Cry as proteínas pertencentes às famílias das caderinas (CAD), aminopeptidases N (APN), fosfatases alcalinas (ALP), glicolipídeos, um glicoconjugado de 270 kDa (BTR-270) e uma proteína de 252 kDa (P252), metaloproteases (ADAM) e  $\alpha$ -glicosidases (Tabela 1). Além disso,



glicolípídeos também estão associados à ligação com toxinas 3D-Cry em Nematoda (Pigott e Ellar 2007).

Tabela 1: Toxinas 3D-Cry e receptores ou moléculas ligantes que foram identificados nas espécies-alvo mais susceptíveis.

Inseto-alvo	Receptor							
	APN	CAD	ALP	glicopeptídeo	BTR-270	P252	$\alpha$ -Glicosidase	ADAM
Ms	Cry1A	Cry1A	Cry1Ac	Cry1A				
Hv	Cry1A	Cry1A	Cry1Ac					
On		Cry1Ab						
Ha	Cry1Aa	Cry1Ac						
Bm	Cry1Aa					Cry1Ac		
Pg		Cry1Ac						
Ld		Cry1A			Cry1Ab			
Px	Cry1A							
Ag			Cry11Ba					
Ae	Cry11Aa	Cry11Ba	Cry11Aa/4Ba					
Aq	Cry11Ba							
Aa							Cry4Ba	
Tm			Cry3Aa					
Dv		Cry3Aa/3Bb						
Lde								Cry3Aa
Ag			Cry1Ba6					

Ms: *Manduca sexta*; Hv: *Heliothis virescens*; On: *Ostrinia nubilalis*; Ha: *Helicoverpa armigera*; Bm: *Bombyx mori*; Pg: *Pectinophora gossypiella*; Ld: *Limantria dispar*; Px: *Plutella xylostella*; Ag: *Anopheles gambiae*; Ae: *Aedes aegypti*; Aq: *Anopheles quadrimaculatus*; Aa: *Anopheles albimanus*; Tm: *Tenebrio molitor*; Dv: *Diabrotica virgifera*; Lde: *Leptinotarsa decemlineata*; Ag: *Anthonomus grandis* (adaptado de Pigott e Ellar 2007; Bravo, Likitvivanavong et al. 2011).

### 1.5. As caderinas são receptores transmembrana para as toxinas 3D-Cry

As caderinas pertencem a uma superfamília de proteínas transmembrana dependentes de cálcio, com uma alta variedade e diversidade de funções, desde a adesão celular até a morfogênese (Pettitt 2005). São proteínas filamentosas compostas estruturalmente por domínios repetidos (CRs – cadherin repeats) com cerca de 110 resíduos de aminoácidos cada domínio. Caderinas apresentam cerca de cinco CRs, entretanto, já foram descritas caderinas com até 34 CRs (Dunne, Hanby et al. 1995; Angst, Marcozzi et al. 2001). Estes domínios são formados por

um  $\beta$  sanduíche com fitas  $\beta$  antiparalelas que apresentam uma topologia do tipo chave-grega (Jin, Walker et al. 2012) e estão conectados entre si por alças e nas junções entre CRs adjacentes estão presentes os sítios de ligação ao cálcio, que formam uma haste rígida e conferem estabilidade à proteína (Gonzalez-Reyes 2003) (Figura 4).

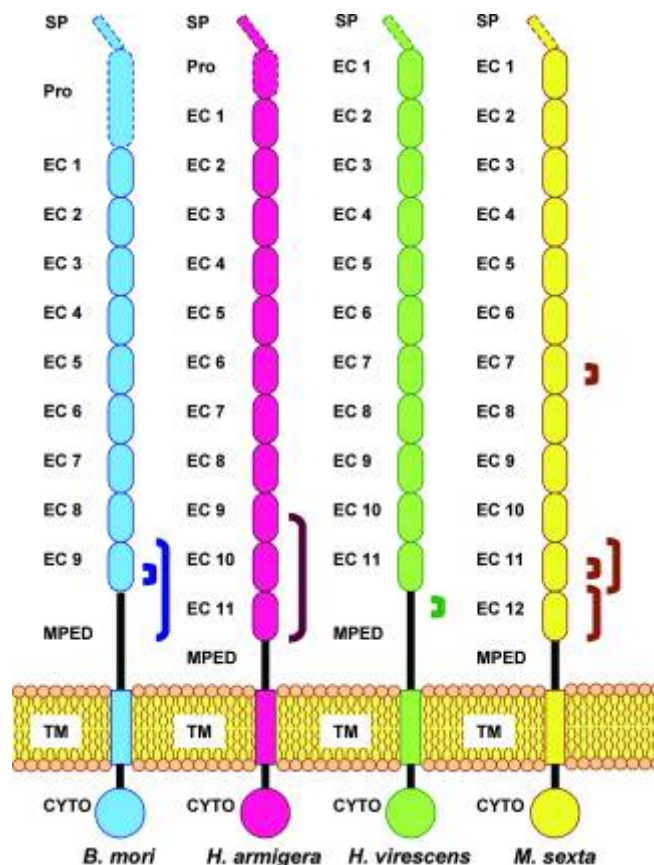


Figura 4: Esquema mostrando a estrutura dos domínios de caderinas ligantes de toxinas 3D-Cry. PRO: região pró-proteína, SP: peptídeo sinal, EC: ectodomínio, MPED: domínio extracelular proximal à membrana; TM, domínio transmembrana e CYTO: domínio citoplasmático (Pigott e Ellar 2007).

A primeira caderina identificada como ligante de uma toxina 3D-Cry foi isolada de *Manduca sexta* e denominada de BT-R1 (Vadlamudi, Ji et al. 1993). Posteriormente, esta proteína foi clonada, sequenciada e validada como receptor para a toxina Cry1Ab (Vadlamudi, Weber et al. 1995). Através de ensaios de ligação com BT-R<sub>1</sub> (expressas em sistemas heterólogos de mamífero e inseto) foi possível demonstrar que este receptor liga-se igualmente às Cry1Aa e Cry1Ac, que são 3D-Crys com atividade tóxica contra *M. sexta*, mas não se liga às Cry3Aa e Cry11Aa, as quais são inócuas para este inseto, ou seja, esta ligação está também associada à toxicidade. Paralelamente, foi demonstrado que Cry1Aa e Cry1Ac inibem a ligação

da Cry1Ab às membranas que expressavam a BT-R<sub>1</sub>, ou seja, as três toxinas Cry1A competem pelo mesmo sítio de ligação (Keeton e Bulla 1997).

Outra caderina foi isolada de *Bombxy mori* (BtR175) e validada como um receptor para a Cry1Aa (Nagamatsu, Koike et al. 1999). A BtR175 apresenta uma identidade de 70% na sequência de aminoácidos com a caderina isolada de *Manduca sexta* (BT-R<sub>1</sub>) e uma afinidade de ligação de 4.0 nM com a Cry1Aa. Além disso, similarmente à BT-R<sub>1</sub>, as outras toxinas Cry1Ab e Cry1Ac competem pelo sítio de ligação da Cry1Aa (Tsuda, Nakatani et al. 2003).

Estudos com populações de *Heliothis virescens* resistentes à Cry1Ac possibilitaram a identificação de uma terceira caderina (Gahan, Gould et al. 2001), posteriormente denominada de HevCaLP e confirmada como receptor para as Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac, com diferentes afinidades de ligação (Jurat-Fuentes, Gahan et al. 2004; Xie, Zhuang et al. 2005; Jurat-Fuentes e Adang 2006).

Até o presente momento, cerca de 60 sequências nucleotídicas e 47 protéicas de caderinas receptoras ou ligantes de pelo menos uma toxina Cry estão depositadas no National Center of Biotechnological Information (NCBI), isoladas de 14 espécies de insetos-alvo: *Manduca sexta* (BT-R1), *Bomboyx mori* (Bt-R175), *Heliothis virescens* (HevCaLP), *Tricoplusia ni*, *Helicoverpa armigera*, *Tenebrio molitor*, *Plutella xylostella*, *Ostrinia nubialis*, *Pectinophora gossypiella*, *Chilo suppressalis*, *Limantria dispar*, *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda* e *Aedes aegypti*.

A ligação a um receptor com uma porção transmembrana, como a caderina, foi demonstrada ser uma etapa importante no mecanismo de ação das toxinas. Contudo, foi possível também identificar que esta ligação não é o único componente desta interação toxina/membrana e outras moléculas também foram identificadas como partícipes.

## 1.6. Receptores ligados à membrana por âncoras do tipo glicofosfatidilinositol (GPI).

### 1.6.1. As aminopeptidases N

As aminopeptidases N (APNs) são metaloproteases dependentes de zinco que clivam as extremidades N-terminais de cadeias polipeptídicas e tem uma participação primordial na digestão dos insetos (Terra e Ferreira 1994). A partir de 1994, APNs conectadas à membrana apical por âncoras do tipo glicofosfatidilinositol (GPI) passaram a ser identificadas como receptores para as toxinas Cry (Takesue, Yokota et al. 1992; Budatha, Meur et al. 2007; Angelucci, Barrett-Wilt et al. 2008). Estas proteínas estão distribuídas em cinco classes e compartilham 61% de identidade na sequência de aminoácidos dentro de uma mesma classe, e 26-38% de identidade entre classes distintas (Herrero, Gechev et al. 2005) (Figura 5).

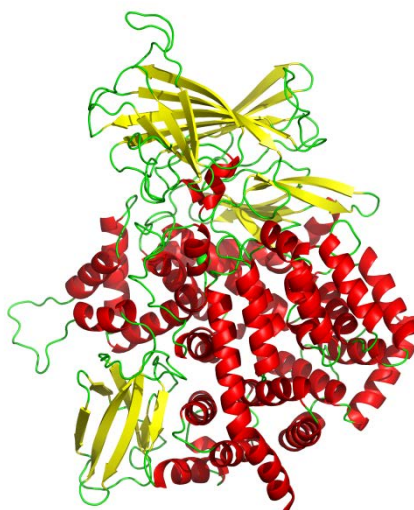


Figura 5: Representação da estrutura terciária teórica de uma APN de *Manduca sexta* modelada a partir da APN humana (PDB 3SE6) (cedido gentilmente por Fonseca FCA).

Estas aminopeptidases N possuem sítios de N e O-glicosilações que são importantes para a interação com as toxinas. Os sítios de O-glicosilações podem variar de seis em *B. mori*, dez em *M. sexta* e 39 em *H. armigera* (Pigott e Ellar 2007). As N-glicosilações da APN1 de *M. sexta* foram mapeadas através de espectrometria

de massa revelando cadeias incomuns para glicoproteínas de insetos (Stephens, 2004).

A aminopeptidase N de *M. sexta* (120 kDa APN) foi a primeira identificada como receptor para as três toxinas Cry1A e até o presente momento é a mais estudada. Este receptor liga-se às toxinas por dois sítios distintos de ligação. O primeiro é compartilhado pelas três toxinas, enquanto que o segundo é exclusivo para a Cry1Ac (Knight, Crickmore et al. 1994; Sangadala, Walters et al. 1994). Além disso, a ligação à Cry1Ac é inibida pela presença de GalNAc.

Três APNs (classe 1, 3 e 4) foram isoladas de *H. virescens* apresentando ligação estável às Cry1A. A primeira, de 170 kDa, liga-se às Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac, mas não às Cry1Ca e Cry1Ea. A segunda de 120 kDa, liga-se à Cry1Ac e Cry1Fa (Gill, Cowles et al. 1995; Banks, Jurat-Fuentes et al. 2001). A terceira, de 110 kDa, liga-se apenas à Cry1Ac (Banks, Jurat-Fuentes et al. 2001; Banks, Hua et al. 2003). A ligação das 170-APN e 120-APN à Cry1Ac é inibida com a adição de GalNAc, todavia, esta mesma ligação é independente das glicosilações no caso da 110-APN (Knight, Crickmore et al. 1994; Lu e Adang 1996; Valaitis, Mazza et al. 1997).

Membranas apicais (BBMVs) de *B. mori* foram tratadas com a fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) que cliva a âncora GPI. As APNs foram então, purificadas por cromatografia de troca iônica (Yaoi, Kadotani et al. 1997). Uma APN de 120 kDa foi isolada através de ensaios de ligação utilizando a Cry1Aa, mas não com as Cry1Ab e Cry1Ac. A mesma APN expressa como proteína de fusão com glutathione-S-transferase (GST), em sistemas heterólogos, apresentou ligação à Cry1Aa, demonstrando que esta ligação não é dependente de glicosilações (Yaoi, Nakanishi et al. 1999).

*Plutella xylostella* e *Helicoverpa armigera* possuem duas APNs pertencentes às classes 1 e 3. Após a clonagem dos genes através de sequências de APNs homólogas, previamente caracterizadas como receptoras para toxinas Cry, fragmentos das APNs foram expressos como proteínas de fusão com GST e utilizados em ensaios de ligação com as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac. As APNs da classe um, de ambas as espécies, ligam-se às Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac, enquanto que a APN da classe 3 de *P. xylostella* liga-se às Cry1Aa e Cry1Ab e a

APN 3 de *H. armigera* liga-se apenas à Cry1Ac (Nakanishi, Yaoi et al. 2002; Rajagopal, Agrawal et al. 2003).

As 3D-Cry Diptera-específicas foram usadas como sondas para identificar aminopeptidases N de *Anopheles quadrimaculatus* e uma proteína de 100 kDa foi isolada como ligante de Cry 11Ba e identificada APN-1 (Abdullah, Valaitis et al. 2006).

Aminopeptidases N da classe 2 foram identificadas como ligantes putativos de toxinas Cry1A após a identificação de uma APN-2 de *M. sexta* através de cromatografia de afinidade utilizando Cry1Ab (Denolf, Hendrickx et al. 1997). Posteriormente, o gene da mesma APN foi expresso em células Sf9 e a proteína resultante foi utilizada em ensaios de ligação com o objetivo de comprovar a ligação. Contudo, os resultados não foram positivos e não houve conclusão sobre a interação entre a APN-2 isolada e a Cry1Ab. APNs de outras espécies-alvo, homólogas à APN-2 de *M. sexta*, foram posteriormente clonadas na tentativa de identificar novos receptores para as toxinas 3D-Cry. Todavia, os resultados até então não são conclusivos.

As interações das aminopeptidases N de insetos suscetíveis com as toxinas do *B. thuringiensis* compõem uma etapa crítica no modo de ação destas toxinas. Existe disponível na literatura, uma vasta quantidade de artigos científicos que apresentam resultados e discutem estas interações. Entretanto, esta informação encontra-se dispersa e contribui efetivamente pouco para elucidar o mecanismo de ação no nível molecular. As APNs que foram comprovadamente validadas como receptores para as toxinas Cry estão acima descritas. Além destas, outras proteínas pertencentes às cinco classes de aminopeptidases N são apontadas como ligantes *in vitro*, mas sem uma correlação direta com alguma interação que por ventura, ocorra *in vivo*.

A despeito disto, a ligação de APNs que apresentam sítios de O-glicosilação (GalNAc) com a Cry1Ac (única toxina descrita até então que contém um sítio GalNAc) está diretamente relacionada com a expressão máxima da mortalidade desta toxina contra as respectivas espécies que tem estas APNs. Ou seja, existe de fato uma influência do sítio de O-glicosilação como mediador da ligação Cry1Ac/APNs (Derbyshire, Ellar et al. 2001).

### 1.6.2. Fosfatases alcalinas

Fosfatases são hidrolases responsáveis pela remoção inespecífica do grupamento fosfato (desfosforilação) em diferentes moléculas. As fosfatases alcalinas (ALP) são ativas em pH básico e nos insetos, encontram-se mais frequentemente fixadas às membranas apicais das microvilosidades intestinais, podendo eventualmente serem encontradas em membranas basolaterais ou mesmo em solução. A fosfatase alcalina melhor estudada em insetos foi isolada de *B. mori* e possui, assim como as aminopeptidases N, uma âncora do tipo GPI, um sítio de ligação ao zinco e N-glicosilações (Terra e Ferreira 1994).

Embora menos estudadas que as CADs, APNs, as ALPs já foram descritas como receptores ou ligantes para as toxinas 3D-Cry em *M. sexta*, *H. virescens*, *Ae. aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Anthonomus grandis* e em *T. molitor*.

As ALPs de *H. virescens* (68 kDa) e de *M. sexta* (65 kDa), ambas com âncoras do tipo GPI, foram validadas como receptores para a Cry1Ac e esta ligação foi relacionada à presença de N-oligossacarídeos com grupamentos Gal-NAc associados (McNall e Adang 2003; Jurat-Fuentes, Gahan et al. 2004).

Em *Ae. aegypti*, a GPI-ALP de 65 kDa é um receptor para as toxinas Cry4Ba e Cry11Aa. Diferentemente das ALPs de Lepidoptera, a ligação com as 3D-Cry não é intermediada por carboidratos (Krieger, Revina et al. 1999; Buzdin, Revina et al. 2002; Fernandez, Aimanova et al. 2006). Entretanto, em *An. gambiae*, a ALP de 65 kDa apresenta sítios putativos de N e O-glicosilação e liga-se à Cry11Ba com uma  $K_d = 23.9$  nM (Hua, Zhang et al. 2009).

No caso dos Coleoptera, nenhuma ALP foi confirmada ainda como receptor para toxinas 3D-Cry. Contudo, em *A. grandis*, duas proteínas, de 62 e 65 kDa, foram isoladas a partir de BBMV's tratadas com PIPLC e incubadas com Cry1Ba6 biotinilada imobilizada em uma matriz de agarose/estreptavidina. Estas duas proteínas foram identificadas como ALPs através de ensaios catalíticos (Martins, Monnerat et al. 2010). Em *T. molitor*, uma ALP de 68 kDa ligante da Cry3Aa também foi isolada de BBMV's tratadas com PIPLC (Zuniga-Navarrete, Gomez et al. 2012).

## 1.7. As toxinas 3D-Cry interagem de forma específica com outros ligantes

Os glicolípídeos têm sido identificados como receptores para as toxinas 3D-Cry entre os Nematoda, especificamente em trabalhos com linhagens de *Caenorhabditis elegans* resistentes às Cry5Ba (Marroquin, Elyassnia et al. 2000; Griffiths, Haslam et al. 2005). Mutações nos genes de uma glicosiltransferase foram associadas aos fenótipos de resistência e a sua contribuição na internalização das toxinas foi demonstrada através de ensaios de fluorescência com Cry5Ba marcada (Kawar, Van Die et al. 2002; Griffiths, Huffman et al. 2003).

BTR-270 é um glicoconjugado que foi isolado de *L. díspar* e apresentou uma afinidade de ligação para as Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac de 49 nM, 17 nM e 390 nM, respectivamente, e não se liga à Cry3Aa (Valaitis, Jenkins et al. 2001). Em *B. mori*, uma proteína de 252 kDa (P252) forma oligômeros de 985 kDa e tem afinidade de ligação de 28.9, 178.5 e 20.0 nM para as Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac, respectivamente (Hossain, Shitomi et al. 2004).

Adicionalmente, uma GPI- $\alpha$ -glicosidase de *An. albimanus* e uma metaloprotease (ADAM-3) de *T. molitor*, foram identificadas como ligantes para as toxinas Cry4Ba e Cry3Aa, respectivamente (Ochoa-Campuzano, Real et al. 2007; Fernandez-Luna, Lanz-Mendoza et al. 2010).

## 1.8. O modo de ação das 3D-Cry e suas controvérsias

### 1.8.1. O modelo de formação de poros em duas décadas de estudos

Existe um consenso de que o mecanismo de ação das toxinas 3D-Cry envolve, em termos gerais, uma sequência de eventos que compreendem a ingestão das protoxinas e a subsequente ativação proteolítica, a qual as converte em toxinas ativas mais resistentes às proteases. Após isto, as toxinas ligam-se aos receptores específicos presentes na membrana apical do epitélio intestinal, se inserem nesta



membrana e ativam canais iônicos não-seletivos, permeáveis a íons, aminoácidos e açúcares. Estes canais interrompem o equilíbrio osmótico das células componentes das microvilosidades, acarretando a lise, morte celular e grande aporte de solutos oriundos do intestino. Do dano provocado no intestino advém a parada na alimentação, intoxicação e morte da larva suscetível (Knowles e Ellar 1987; Schnepf, Crickmore et al. 1998).

Em contraste, os aspectos mais específicos do mecanismo molecular de ação têm sido mais extensivamente estudados apenas com o binômio *Manduca sexta*/Cry1Ab, extrapolados para toda a família de 3D-Cry e exaustivamente discutidos em uma série de artigos de revisão (Bravo, Gill et al. 2007; Soberon, Fernandez et al. 2007; Jimenez-Juarez, Munoz-Garay et al. 2008; Pardo-Lopez, Munoz-Garay et al. 2009; Soberon, Gill et al. 2009; Bravo, Likitvivanavong et al. 2011). Estes estudos resultaram na formulação de um modelo para explicar o modo de ação que se baseia na formação de um oligômero (trímeros ou tetrâmeros) de toxinas ativas, inserção deste na membrana e subsequente formação do canal iônico (Knowles e Ellar 1987; Bravo, Gomez et al. 2004).

De acordo com este modelo, denominado de formação de poros (ou modelo Bravo, *sequential binding, punching hole*) (Figura 6), a toxina ativa se liga sequencialmente a diferentes receptores de membrana. Inicialmente, a Cry1Ab ativa interage, com baixa afinidade de ligação, com receptores do tipo ALP ( $K_d = 101$  nM) e APN ( $K_d = 267$  nM), através das porções  $\beta 16$  (domínio III) e alça 3 (domínio II), respectivamente (Masson L, Lu YJ et al. 1995; Gomez, Arenas et al. 2006; Pacheco, Gomez et al. 2009; Arenas, Bravo et al. 2010).

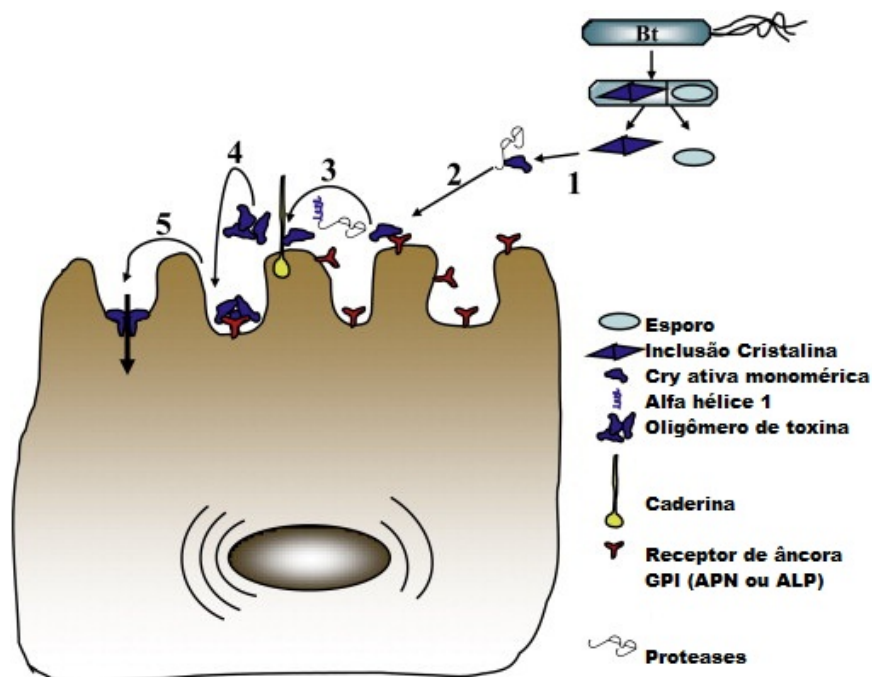


Figura 6: Esquema mostrando as etapas do mecanismo de ação das 3D-Cry de acordo com o modelo de formação de poros. Extraído de (Bravo, Likitvivanavong et al. 2011)

As APNs e ALPs, ancoradas por grupamentos GPI são enzimas abundantes na membrana que concentram as toxinas ativas nas microvilosidades e esta aproximação facilita a interação, agora com alta afinidade ( $K_d = 1 \text{ nM}$ ), da extremidade do domínio II da Cry1Ab ( $\alpha$  hélice 8, alças 2 e 3) com os CRs proximais dos receptores do tipo caderina, a saber, CRs 7, 11 e 12, respectivamente (Gomez, Miranda-Rios et al. 2002; Xie, Zhuang et al. 2005; Gomez, Arenas et al. 2006; Atsumi, Inoue et al. 2008).

A ligação com a caderina promove uma última clivagem proteolítica na alça que liga as  $\alpha$  hélices 1 e 2, com a remoção da primeira. Esta clivagem expõe resíduos hidrofóbicos do domínio I, bem como resíduos do bloco conectivo entre os domínios I e II, provocando mudanças conformacionais que resultam na oligomerização (Gomez, Dean et al. 2003; Soberon, Pardo-Lopez et al. 2007). Soberon et al. 2007, também demonstraram que a clivagem posterior à ligação com a caderina é essencial para a oligomerização, uma vez que a Cry1Ab expressada sem a  $\alpha 1$  e em sistemas heterólogos está apta a formar o oligômero mesmo na ausência dos receptores do tipo caderina.

Esta mesma ligação dos CRs proximais de caderinas às toxinas 3D-Cry com o aumento da atividade da respectiva toxina também foi demonstrada para outras espécies, além de *M. sexta*. Larvas de *An. gambiae* e *Diabrotica virgifera* que foram

alimentadas com peptídeos de fragmentos ligantes de caderina tiveram a sua suscetibilidade aumentada às Cry4Ba e Cry3Aa, respectivamente (Hua, Zhang et al. 2008; Park, Abdullah et al. 2009).

Os oligômeros de Cry1Ab, também denominados de estrutura pré-poro, possuem uma afinidade de ligação pelas membranas de *M. sexta* 200 vezes maior do que a toxina no estado monomérico ( $K_d = 0.6$  nM para a APN e  $K_d = 0.5$  nM para a ALP). Este aumento está relacionado com a participação da alça 2 (domínio II) nas interações com estes receptores e esta ligação culmina na inserção do oligômero na membrana, com formação do poro e lise celular (Pardo-Lopez, Gomez et al. 2006; Arenas, Bravo et al. 2010).

As substituições de resíduos presentes nas  $\alpha$ -hélices 3 e 4, no domínio I da Cry1Ab geraram toxinas modificadas inócuas para *M. sexta*. Esta alteração é devida à perda da capacidade de formar oligômeros e se inserir na membrana, indicando a contribuição destes resíduos para esta etapa no modo de ação (Vachon, Prefontaine et al. 2002; Jimenez-Juarez, Munoz-Garay et al. 2007; Girard, Vachon et al. 2008; Rodriguez-Almazan, Zavala et al. 2009).

Efetivamente, a oligomerização ocorre com a participação de resíduos polares presentes nas  $\alpha$ -hélices 4 e 5, embora haja a contribuição dos resíduos adjacentes. (Vachon, Prefontaine et al. 2004; Alzate, You et al. 2006; Likitvivatanavong, Aimanova et al. 2009). Os oligômeros de toxina podem apresentar uma estrutura trimérica, como foi demonstrado para a Cry4Ba (Boonserm, Mo et al. 2006) ou tetramérica, para a Cry1Ab (Gomez, Sanchez et al. 2002)

Todavia, a inserção dos oligômeros na membrana depende da participação de resíduos hidrofóbicos, sobretudo os presentes nas  $\alpha$  hélices 4, 5 e 7, do domínio I (Alcantara, Alzate et al. 2001). Após a oligomerização e segunda ligação às APNs e ALPs, as unidades que compõem o oligômero sofrem grandes mudanças conformacionais (Zavala, Pardo-Lopez et al. 2011). Estas mudanças são dependentes da quebra de pontes salinas que ligam os domínios I e II e que aumentam a flexibilidade interdomínios (Coux, Vachon et al. 2001; Rausell, Pardo-Lopez; et al. 2004). Em seguida, estes resíduos hidrofóbicos, que nas toxinas monoméricas estão voltados para o cerne do domínio I, são translocados para a membrana e se inserem nos microdomínios lipídicos (Schwartz, Juteau et al. 1997; Girard, Vachon et al. 2009). A morte celular ocorre após a perda do equilíbrio

osmótico e ruptura da membrana com extravazamento do conteúdo intracelular para a luz do intestino.

Embora a maior parte destes resultados represente décadas de estudos consistentes sobre o tema, alguns aspectos da cadeia de eventos do modelo de formação de poros ainda permanecem desconhecidos, como a contribuição efetiva da ligação entre as toxinas e as diferentes classes de receptores, a importância da clivagem da  $\alpha$  hélice 1, a oligomerização e formação da estrutura pré-poro e a participação dos oligômeros de toxinas e das formas monoméricas na expressão máxima da toxicidade (Vachon, Laprade et al. 2012).

### 1.8.2. O modelo de transdução de sinal

Outro modelo propõe um mecanismo molecular diferente para o padrão de citopatologia provocado pelas toxinas 3D-Cry, baseado na transdução de sinal dependente de magnésio (Zhang, Candas et al. 2005) e envolvendo a ativação do complexo protéico G, adenil ciclase, AMP cíclico, quinase A (PKA), culminando na desestabilização do citoesqueleto e indução da morte celular (Zhang, Candas et al. 2005; Zhang, Candas et al. 2006). Os autores postularam este modelo baseados na morfologia celular de linhagens S5 transfectadas com BT-R<sub>1</sub>, tratadas com quelantes de Ca<sup>2+</sup> (EGTA) e Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> (EDTA) e incubadas com Cry1Ab. Embora todos os tratamentos apresentassem indícios da ligação Cry1Ab/BT-R<sub>1</sub>, a morte celular foi inibida apenas no tratamento com EGTA, indicando a presença de um mecanismo de transdução de sinal ativado a partir da ligação toxina/receptor. Este modelo desconsidera aspectos importantes que já foram anteriormente demonstrados por outros autores como, por exemplo, a ligação das toxinas com os demais receptores, bem como a oligomerização das 3D-Cry (Vachon, Laprade et al. 2012).

## 1.9. Toxinas 3D-Cry produzidas pela EMBRAPA.

### 1.9.1. Algodão e Cana-de-Açúcar: demandas nacionais

As culturas do algodão e cana-de-açúcar no Brasil têm grande importância devido à alta produção, impacto social, econômico e até político que alcançam em nosso país. O algodão gera um grande número de empregos diretos e indiretos, uma vez que afeta toda a cadeia têxtil nacional, enquanto que a cana-de-açúcar é uma das melhores fontes alternativas de biocombustíveis renováveis capaz de atender a demanda atual de produção de energia.

Apesar da produção, a produtividade destas culturas no Brasil é limitada devido à presença de insetos-praga altamente adaptados aos ambientes de monocultura em larga escala causando, por conseguinte, sérios prejuízos. O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) é a principal praga da cotonicultura, enquanto que a Broca Gigante da Cana-de-Açúcar (*Telchin licus licus*) é uma espécie extremamente danosa à lavoura canavieira.

O hábito endofítico das larvas, tanto de *A. grandis* quanto de *T. licus licus*, dificulta o controle convencional químico ou biológico. Sendo assim, a obtenção de plantas resistentes a estes insetos através da transgenia se apresenta como uma alternativa promissora.

As toxinas 3D-Cry, produzidas por *Bacillus thuringiensis*, vêm sendo usadas na geração de plantas geneticamente modificadas cultivadas com bastante sucesso (James, 2010). Porém, as toxinas disponíveis atualmente no mercado apresentam uma baixa toxicidade contra o bicudo-do-algodoeiro e a broca gigante, de acordo com os bioensaios realizados anteriormente pela EMBRAPA. Portanto há a necessidade do desenvolvimento de variedades de algodão e cana-de-açúcar GM adequados aos hábitos endofíticos destes insetos. Este fato reforça a demanda por novas moléculas para a geração destas plantas GM.

### 1.9.2. Toxinas Cry8Ka e Cry1Ia12

O Laboratório da Interação Molecular Planta-Praga (LIMPP), Embrapa GENARGEN, desenvolve uma linha de pesquisa bastante consolidada na busca por toxinas 3D-Cry mais eficientes contra as pragas das principais plantas cultivadas no Brasil.

Visando buscar moléculas ativas contra estes dois insetos-praga, a Embrapa isolou e caracterizou os genes *cry8Ka1* e *cry1Ia12*, a partir da cepa S811 de *B. thuringiensis* (Grossi-de-Sa, Quezado de Magalhaes et al. 2007).

A partir destes dois genes e utilizando protocolos de evolução molecular (*DNA shuffling* e *Phage display*), três trabalhos anteriores a esta tese foram executados isoladamente e em paralelo, ambos com o objetivo final de gerar toxinas Cry8Ka e Cry1Ia12 modificadas com maior atividade contra o bicudo e a broca, respectivamente (Craveiro, Gomes Junior et al. 2010; Nakasu, Firmino et al. 2010; Oliveira, Silva et al. 2011).

Os experimentos de evolução molecular se baseiam na geração de variabilidade (*DNA shuffling*) (Stemmer, 1994) e posterior seleção artificial desta mesma variabilidade (*Phage display*) (Willats, 2002).

Nos ensaios de *Phage display*, as BBMV's extraídas de *A. grandis* e *T. licus licus* foram utilizadas como ligantes para as toxinas Cry8Ka1 e Cry1Ia12, respectivamente. Posteriormente, após os bioensaios foram selecionadas uma variante da Cry8Ka1, denominada Cry8Ka5 (Oliveira, Silva et al. 2011) e três variantes da Cry1Ia12 (Craveiro, Gomes Junior et al. 2010), todas com modificações na atividade contra os respectivos insetos-alvo.

Os valores obtidos das  $LC_{50}$  das Cry8Ka contra *A. grandis* indicaram um aumento de três vezes na toxicidade de Cry8Ka5 ( $2,83 \pm 1,17 \mu\text{g/mL}$ ) em comparação com a proteína original Cry8Ka1 ( $8,93 \pm 3,23 \mu\text{g/mL}$ ) (Oliveira, Silva et al. 2011). As mortalidades de *T. licus licus*, aferidas por contagem direta, em bioensaios exploratórios foram de 24,68% para a Cry1Ia12 original, 61,25% para a Cry1Ia12-1, 75,43% para a Cry1Ia12-2 e 58,35% para a Cry1Ia12-3 (Craveiro, Gomes Junior et al. 2010).

Posteriormente, com o objetivo de buscar possíveis implicações estruturais e funcionais, as sequências de aminoácidos das toxinas obtidas (originais e variantes) foram utilizadas na elaboração dos modelos tridimensionais teóricos e na análise das contribuições das mutações nas atividades detectadas. Estes resultados fazem parte do escopo desta tese.

#### 1.10. Modelagem Molecular de Proteínas

As propriedades físico-químicas e biológicas das moléculas dependem diretamente da estrutura tridimensional e suas variações (estados conformacionais). Estas conformações podem ser definidas como o arranjo de todos os átomos da molécula em um espaço cartesiano cujas interconvenções ocorrem sob a influência dos ângulos e comprimentos das ligações, além das rotações e eventuais distorções (Leach 2001).

Os estudos de cristalografia e ressonância magnética nuclear têm propiciado informações importantes na identificação de aspectos funcionais tais como sítios ativos, regiões flexíveis e interações intramoleculares (Samish, Gu et al. 2009). Entretanto, estes estudos experimentais não permitem a análise refinada das funções e conformações que variam ao longo de um determinado intervalo de tempo, nem em condições experimentais que não possam ser impostas às amostras, por limitações inerentes às técnicas (Samish, Gu et al. 2009).

A caracterização da variação dos estados conformacionais é de extrema importância para o entendimento da plasticidade funcional, das interações proteína-proteína, entre outras propriedades. Dentro deste contexto, as informações presentes em uma estrutura rígida podem ser usadas para produzir um padrão dinâmico contínuo, e assim, simular a estrutura estática ou uma região específica desta mesma estrutura em função do tempo (Fernandez-Ballester e Serrano 2006).

A dinâmica molecular (DM) compreende um conjunto de métodos utilizados na análise conformacional de moléculas. Os primeiros estudos de simulações do movimento de proteínas foram os trabalhos de Levitt e Lifson, em 1969, sobre a energia de minimização da lisozima e mioglobina (Wodak e Janin 1978). Posteriormente, um estudo aplicando a mecânica molecular Newtoniana clássica em

um sistema contendo um inibidor de tripsina pancreática bovina no vácuo marcou a transição dos estudos de minimização para a dinâmica molecular propriamente dita (McCammon, Gelin et al. 1977). Entretanto, apenas em 1988 o mesmo sistema foi simulado na presença de água (Levitt e Sharon 1988).

As simulações de DM provêm um histórico do movimento dos átomos (trajetória) de uma proteína que permite a caracterização microscópica deste sistema. A transposição destas informações no nível microscópico em características macroscópicas requer uma análise estatística. Esta análise é baseada no princípio de que um grande número de observações realizadas em um único sistema e coletadas em tempos consecutivos representa estatisticamente as mesmas propriedades de todos os sistemas similares, contidos em espaços descontínuos e observadas em um único tempo (Samish 2009).

A dinâmica molecular foi incorporada à bioinformática estrutural e tornou-se uma ferramenta bastante difundida nos estudos sobre a estrutura e a dinâmica de biomoléculas (Wako, Kato et al. 2004).

As sucessivas configurações obtidas em simulações de DM são geradas pela integração das equações de movimento de Newton como função do tempo:

$$\frac{d^2 x_i}{dt^2} = \frac{F_{x_i}}{m_i}$$

onde  $d^2 x_i/dt^2$  é a aceleração de uma partícula  $i$  de massa  $m_i$  e  $F_i$  é a força sobre esta partícula em um determinado instante  $t$ . O somatório de soluções para tempos consecutivos gera uma trajetória que descreve o movimento das partículas do sistema, em função do tempo (Leach 2001).

Os átomos do sistema são acelerados por uma força  $F_i$  que promove uma alteração nas coordenadas cartesianas em função do tempo. Contudo, as inferências destas mudanças sobre as propriedades químicas das moléculas simuladas estão relacionadas com as variações nas energias potencial e cinética que ocorrem entre as posições consecutivas dos átomos, ou seja, uma função de energia potencial pseudoempírica capaz de representar a energia necessária para



distorcer a estrutura da proteína, dentro de um espectro natural de flutuações (Samish 2009).

Sendo assim, uma segunda apresentação da mesma equação irá representar a superfície de energia potencial relacionada a cada tipo de molécula, sendo então descrita pelo Campo de Força ( $V$ ) (Schlick 2006).

$$F_i = \frac{-\partial V(r_i, \dots, r_n)}{\partial r_i}$$

O campo de força é um conjunto de funções e parâmetros usados nas simulações de dinâmica molecular que utilizam a mecânica molecular (Samish, Gu et al. 2009).

Esta energia potencial inclui termos aditivos intramoleculares para os átomos ligados e os termos intermoleculares para as interações entre átomos não ligados:  $V(R)_{total} = V(R)_{interna} + V(R)_{externa}$  (Samish, Gu et al. 2009).

A energia interna é calculada através dos somatórios que definem as ligações entre os átomos, os ângulos destas ligações e os diedros.

$$V(R)_{interna} = \sum_{lig} K (b - b_0)^2 + \sum_{ang} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{die} K_\chi [1 + \cos(n_\chi - \sigma)]$$

Os termos  $b_0$ ,  $\theta_0$  e  $\chi$  representam os parâmetros referência para a distância da ligação, o ângulo entre três átomos ligados e o diedro formado entre quatro átomos ligados ou ângulos diedrais, respectivamente. Como existem variações dos parâmetros dependendo do estado de hibridização e dos grupos vizinhos, os campos de força incluem muitos subtipos para cada átomo, de acordo com a natureza química do átomo e o contexto de ligações dos mesmos (Samish, Gu et al. 2009).

Dois outros termos adicionais são inseridos nos campos de força: a distância entre dois átomos que estão conectados indiretamente por um terceiro (Urey-Bradley) e os termos impróprios que estão relacionados com o espectro vibracional empírico.

$$\sum_{imp} K_{\varphi} (\varphi - \varphi_0)^2 + \sum_{UB} K_{UB} (S - S_0)^2$$

Os termos de interações intermoleculares estão relacionados com as interações eletrostáticas coulômicas e interações de van der Waals:

$$V(R)_{externa} = \sum_{nb} \left\{ \varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{R_{ij}^{min}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{R_{ij}^{min}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\varepsilon_d r_{ij}} \right\}$$

As repulsões interatômicas de curto espectro e de van der Waals são expressas, via de regra, utilizando o potencial de Lennard-Jones (Lennard-Jones 1931). O termo  $R_{ij}^{min}$  representa a distância  $r_{ij}$  quando o potencial L-J é zero e  $\varepsilon_{ij}$  representa o ponto da curva onde a energia é mínima. As interações eletrostáticas são representadas pelas respectivas cargas ( $q_i$  e  $q_j$ ) dos átomos (Samish, Gu et al. 2009).

Existem alguns conjuntos de forças descritos e disponíveis para as simulações de dinâmica molecular e a maioria foi parametrizado para estudos de proteínas. Entre os mais utilizados estão o AMBER (Case, Cheatham et al. 2005), CHARMM (MacKerell, Bashford et al. 1998), CVFF (Kitson e Hagler 1988), TRIPOS (Clark, Cramer et al. 1989), OPLS (Jorgensen e Tirado-Rives 1988) e GROMOS96 (Van Gunsteren 1996).

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo estudar a dinâmica conformacional das delta-endotoxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry3Aa, Cry8Ea1, Cry8Ka1, Cry8Ka5 e Cry1Ia12 do *Bacillus thuringiensis*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar estrutural e conformacionalmente as flexibilidades global e local das Cry1Aa, Cry1Ac, Cry3Aa e Cry8Ea1.
- Analisar a influência da perda da  $\alpha$ -hélice 1 sobre a estabilidade conformacional das toxinas 3D-Cry.
- Analisar a influência da  $\alpha$  hélice 1 sobre as regiões que interagem com os receptores de insetos-alvo ( $\alpha$  8, alça 2, alça 3 e  $\beta$  16), nas toxinas Cry1Aa e Cry1Ac.
- Identificar as possíveis implicações estruturais e funcionais decorrentes das mutações nas toxinas Cry8Ka5 e Cry1Ia12, obtidas no LIMPP/EMBRAPA contra o Bicudo do Algodoeiro e a Broca Gigante da Cana-de-açúcar.
- Identificar a estabilidade das interações intermoleculares entre Cry1Ab e a caderina de *Manduca sexta* (CAD-Ms), focando nas mudanças estruturais.

### 3. Metodologia

#### 3.1. Programas utilizados

As metodologias de modelagem molecular (modelagem por homologia, simulações de mecânica molecular e *docking molecular*) que foram utilizadas na presente tese estão descritas detalhadamente a seguir. Os programas e servidores utilizados dividem-se em quatro grupos:

- Visualização dos sistemas: Pymol (Delano 2002) e VMD (Humphrey, Dalke et al. 1996).
- Modelagem molecular por homologia: MODELLER 9v8 (Sali, Potterton et al., 1995) e PROCHECK (Laskowski, Macarthur et al. 1993).
- Simulações de dinâmica molecular: GROMACS (Berendsen 1984) e Campo de força GROMOS96 43a1 (Van Gunsteren 1996).
- Cálculos de *docking molecular*: ClusPro (Comeau, Gatchell et al. 2004) e Rosetta (Rohl, Strauss et al. 2004).

#### 3.2. Proteínas modeladas

As proteínas que tiveram suas estruturas tridimensionais modeladas por homologia no presente trabalho estão listadas na tabela 2, juntamente com o molde e o código de acesso ao PDB.

As estruturas cristalográficas dos moldes (tabela 2) foram escolhidas com base na identidade na sequência de aminoácidos e as sequências dos mesmos foram alinhadas utilizando o programa Muscle ([http://phylogenomics.berkeley.edu/cgi-bin/muscle/input\\_muscle.py](http://phylogenomics.berkeley.edu/cgi-bin/muscle/input_muscle.py)) (Edgard, 2004) e posteriormente ajustadas manualmente. Os alinhamentos foram submetidos ao MODELLER 9v8 para gerar vinte estruturas-modelo.

A modelagem molecular por homologia foi realizada de forma interativa. Os vinte modelos construídos baseados no alinhamento inicial com as sequências dos moldes foram analisados com o programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993). As regiões desfavoráveis pelo gráfico de Ramachandran, consideradas de baixa qualidade, tiveram o alinhamento reformulado para garantir a melhor precisão possível. O alinhamento alternativo foi então submetido novamente ao MODELLER, contendo alterações no *script*. Posteriormente, foi aplicada uma ferramenta para minimização de energia com o relaxamento das estruturas.

As coordenadas atômicas do modelo da Cry1Ia12-ori foram utilizadas como molde para se construir os modelos das toxinas variantes de 1 a 3. E as coordenadas da Cry8Ka1 foram utilizadas para a obtenção do modelo da Cry8Ka5.

Tabela 2: Toxinas 3D-Cry de *Bacillus thuringiensis* e Caderinas que foram modeladas por homologia

Estrutura modelada	Molde	PDB ID
Cry1Ab	Cry1Aa	1CIY
Cry1Ac	Cry1Aa	1CIY
Cry1Ia12 ori	Cry3Bb1	1JI6
	Cry8Ea1	3EB7
Cry1Ia12 - 1	Cry1Ia12 ori	-
Cry1Ia12 - 2	Cry1Ia12 ori	-
Cry1Ia12 - 3	Cry1Ia12 ori	-
Cry8Ka1	Cry8Ea1	3EB7
Cry8Ka5	Cry8Ka1	-
CAD-Ms	eCAD-XI	1L3W
	tCAD-XI	3K6D
CAD-Ha	CAD-Ms	-

Tabela 3: Toxinas variantes da Cry1Ia12, mutações e mortalidade aferida para *T. licus licus*.

Variante	Mutação	Domínio	Mortalidade
1	D233N	I	27,9%
	E639G	III	
2	D233N	I	75,4%
3	I116T	I	58%
	L266F	II	
	K580R	III	

### 3.3. Sistemas simulados

Para os estudos de DM foram escolhidas quatro toxinas: Cry1Aa (PDB 1CIY), Cry1Ac (modelada a partir da Cry1Aa), Cry3Aa (PDB 1DLC) e Cry8Ea1 (PDB 3EB7). Estas proteínas foram escolhidas por serem as toxinas descritas classicamente na literatura como referência para o mecanismo de ação e, portanto, são as que possuem mais dados experimentais discutidos sobre a toxicidade, ligação aos respectivos receptores e resíduos ligantes mapeados.

Cada uma das estruturas das toxinas foi utilizada na montagem de dois sistemas, o primeiro com a toxina inteira e o segundo com a retirada da  $\alpha 1$ , na prolina da alça localizada entre as  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  (Figura 7).



Figura 7: Representação esquemática das estruturas simuladas. A  $\alpha 1$  está destacada em vermelho.

### 3.4. Simulações de DM

As simulações de DM foram executadas utilizando o GROMACS v. 3.3.3. (Berendsen 1984) e o campo de força GROMOS43a1 (Van Gunsteren 1996). O protocolo de simulação segue descrito abaixo, de acordo com de Groot & Grubmüller (2001).

Para a montagem dos sistemas, cada proteína foi solvatada em uma caixa cúbica com condições periódicas de contorno e utilizando como solvente, moléculas de água SPC (*Single Point Charge*) (Berendsen *et al.*, 1987). Os contra-íons cloreto ou sódio, quando necessários, foram adicionados aos sistemas com o objetivo de neutralizar a carga líquida dos mesmos. As interações eletrostáticas foram calculadas utilizando o método *Particle-Mesh Ewald* (PME) com raios de corte de Coulomb e van der Waals de 9 Å (Darden *et al.*, 1993). Para a restrição das ligações covalentes foi aplicado o método Lincs (Hess *et al.*, 1997), a fim de possibilitar 2 fs como passo de integração. Para todas as simulações a temperatura foi mantida à 310K. O acoplamento do soluto, íons e solvente a banhos externos de temperatura e pressão foi empregado para manter as temperatura e pressão constantes. As

constantes de acoplamento foram de  $\tau = 0,1$  ps e  $\tau = 0,5$  ps, respectivamente (Berendsen *et al.*, 1984) e a constante dielétrica do meio foi de  $\epsilon = 1$ .

Inicialmente foi realizada uma termalização que promoveu um aquecimento gradativo dos sistemas, a fim de evitar as deformações nas toxinas estudadas. Este aumento gradual da temperatura consistiu em um passo de 5 ps a 50K com restrição de posição, seguido de seis outros passos de 5 ps com aquecimento lento de 50K a 310K. Com isso a cada passo, havia um aumento da temperatura em 50K.

Ao final da termalização, os sistemas aquecidos a 310K e em estado de equilíbrio seguiam a simulação até 50 ns.

### 3.5. Cálculos de *docking* molecular

Os cálculos de *docking* foram utilizados para a busca de coordenadas passíveis de formar um heterodímero da Cry1Ab com a caderina de *Manduca sexta* (CAD-Ms), tomando como base a descrição das regiões ligantes tanto na Cry1Ab quanto na CAD-Ms.

As coordenadas atômicas dos modelos teóricos da CAD-Ms e da Cry1Ab foram submetidas aos programas ClusPro (Comeau, Gatchell *et al.* 2004) e Rosetta (Rohl, Strauss *et al.* 2004), sem restrições, a fim de observar a confluência dos resultados com os dados disponíveis na literatura. Os resultados de melhor energia e coincidentes com as interfaces de interação descritos na literatura foram escolhidos.



## 4. Resultados

### 4.1. Análise das mutações das Cry8Ka e Cry11a12

#### 4.1.1. Cry8Ka5

Nas toxinas Cry8Ka1 e Cry8Ka5, os cinco blocos de sequências conservadas são característicos das toxinas 3D-Cry e situam-se nas seguintes regiões: F127-W156, W200-D244, L441-V488, K509-A519 e I582-P591. Nenhuma das mutações presentes na Cry8Ka5 está localizada dentro desses blocos conservados, ou seja, para as duas toxinas Cry8Ka estas regiões são idênticas.

As estruturas finais, quando submetidas ao PROCHECK, apresentaram 93% dos resíduos de aminoácidos situados na região favorável, 6,2% em regiões permitidas e 0,8% em regiões desfavoráveis, para a Cry8Ka1 e 92,6% em regiões favoráveis, 6,6% em regiões permitidas e 0,8% em regiões desfavoráveis para a Cry8Ka5 (Figura 8).

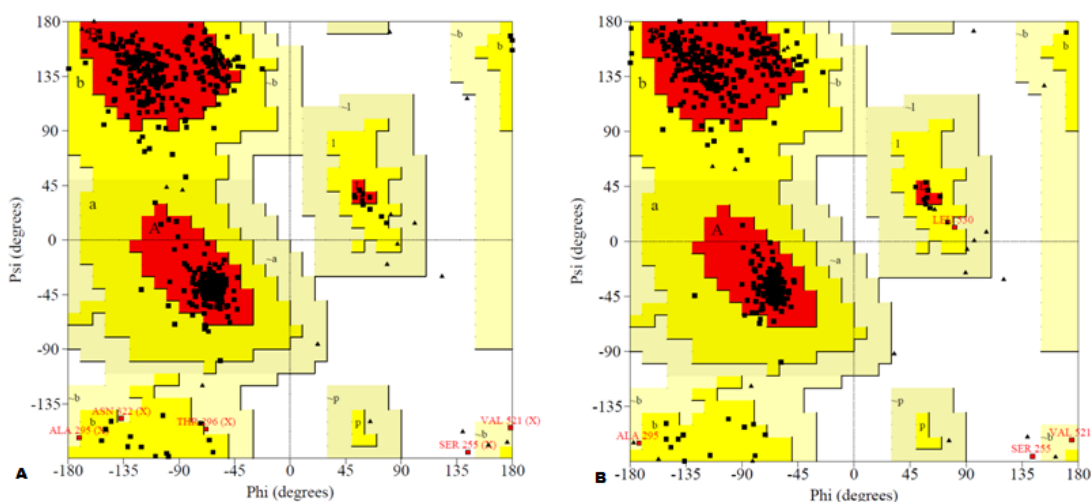


Figura-8 Gráfico de Ramachandran das Cry8Ka modeladas. A: Cry8Ka1. B: Cry8Ka5.

Os modelos das duas Cry8Ka apresentam a mesma estrutura globular típica de toxinas 3D-Cry, com três domínios contíguos e contínuos, diferindo apenas as cadeias laterais dos seis resíduos substituídos. Na Cry8Ka1 o domínio I contém a porção dos resíduos 1-238, o domínio II dos 239-450 e o domínio III, 451-594.

As seis substituições (R82Q, Y260C, P321A, R508G, K538E e E594N) foram localizadas na estrutura modelada da Cry8Ka5. A primeira mutação está localizada na hélice  $\alpha_3$  do domínio um, as duas seguintes estão situadas na folha  $\beta_5$  e na hélice  $\alpha_8$ , do domínio dois e as três últimas distribuídas ao longo do domínio três, na alça entre as fitas  $\beta_{20}$  e  $\beta_{21}$  e nas fitas  $\beta_{20}$  e  $\beta_{23}$ , respectivamente. Todas estas mutações estão localizadas na superfície da proteína expostas para o solvente, exceto a mutação R82Q que está situada na interface entre os domínios I e III (Figura 9).

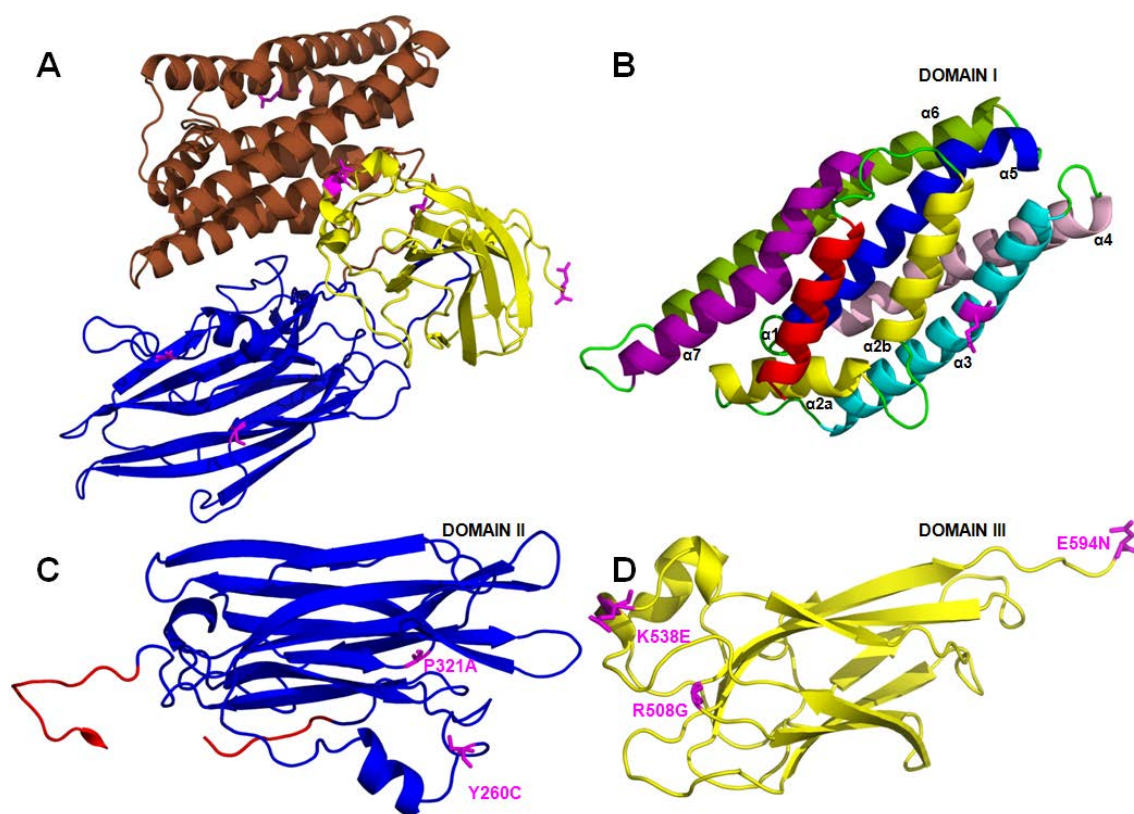


Figura 9: Representação esquemática da estrutura tridimensional da Cry8Ka5, indicando as mutações. A: toxina inteira; B: Domínio um; C: Domínio dois e D: Domínio três. As substituições estão representadas em licorice na cor magenta.

Quatro das seis substituições apresentaram uma modificação no padrão do potencial eletrostático de superfície (PES) (R82Q, Y260C, R508G e K538E) (Figura 10). As mutações R82Q (Figura 10A e 10B), Y260C (Figura 10C e 10D) e R508G

(Figura 10E e 10F) tornaram a carga líquida local menos positiva, enquanto que a mutação K538E (Figura 10G e 10H) promoveu uma mudança mais acentuada no potencial de superfície, tornando a região negativa. Adicionalmente, as quatro substituições estão próximas a regiões mapeadas como importantes para o mecanismo de ação das toxinas 3D-Cry.

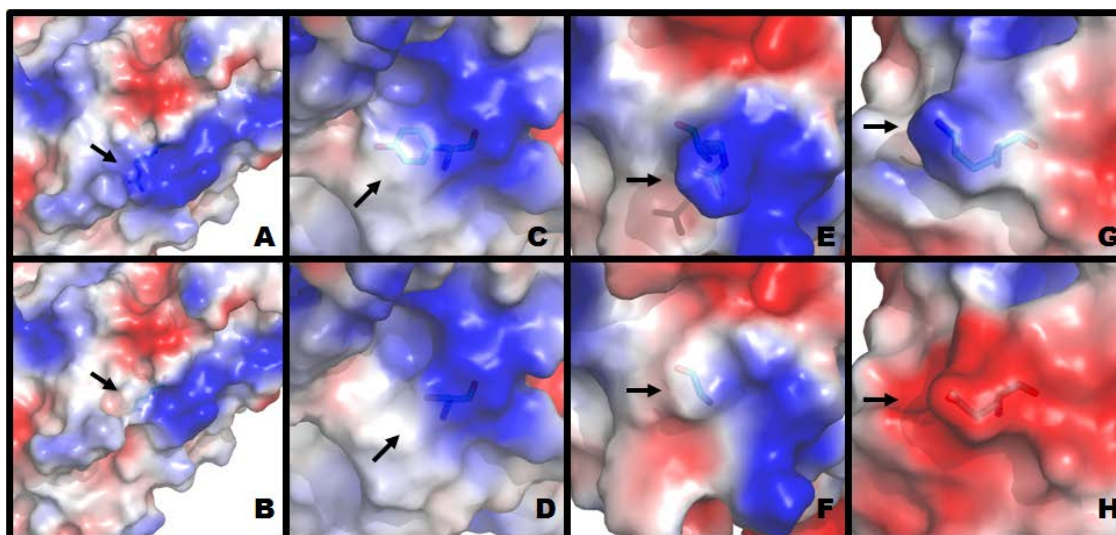


Figura 10: Representação esquemática do potencial eletrostático de superfície (PES) local nas regiões modificadas das Cry8Ka. A, C, E e G representam os resíduos R82, Y260, R508 e K538 da Cry8Ka1, respectivamente. B, D, F e H representam os resíduos Q82, C260, G508 e E538 da Cry8Ka5, respectivamente (as setas indicam os resíduos mutados).

#### 4.1.2. Cry1Ia12

Os melhores modelos foram escolhidos a partir da análise do gráfico de Ramachandran, utilizando o PROCHECK (Figura 11) e as cinco substituições foram localizadas nas estruturas das proteínas variantes. Três no domínio I: I116T, localizada na alça entre as  $\alpha 2b$  e  $\alpha 3$  da variante três; D233N, presente na  $\alpha 6$  nas variantes um e dois e L266F, localizada na  $\alpha 7$  da variante 3. Duas mutações estão presentes no domínio III: K580R, localizada na  $\beta 16$  da variante três e E639G, localizada na  $\beta 19$  da variante um (Figura-12).

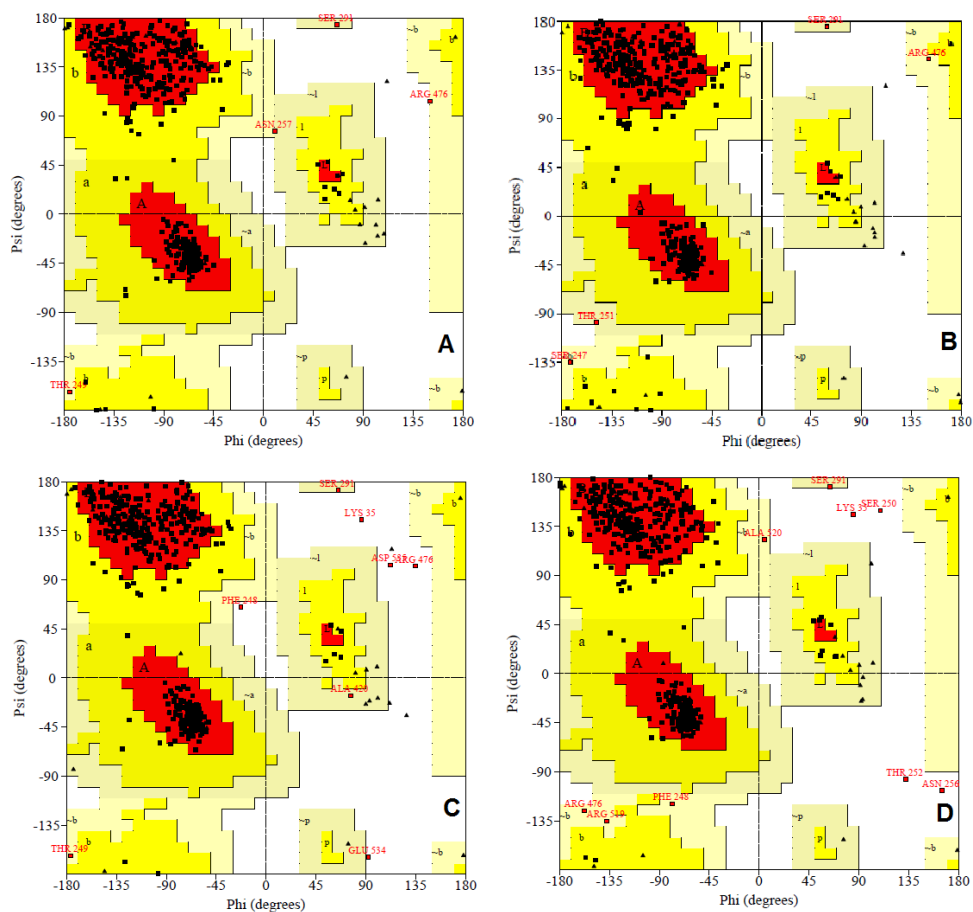


Figura-11 Gráfico de Ramachandran das Cry1Ia12 modeladas. A: Cry1Ia12 original. B, C e D: Cry1Ia12 variantes 1, 2 e 3, respectivamente.

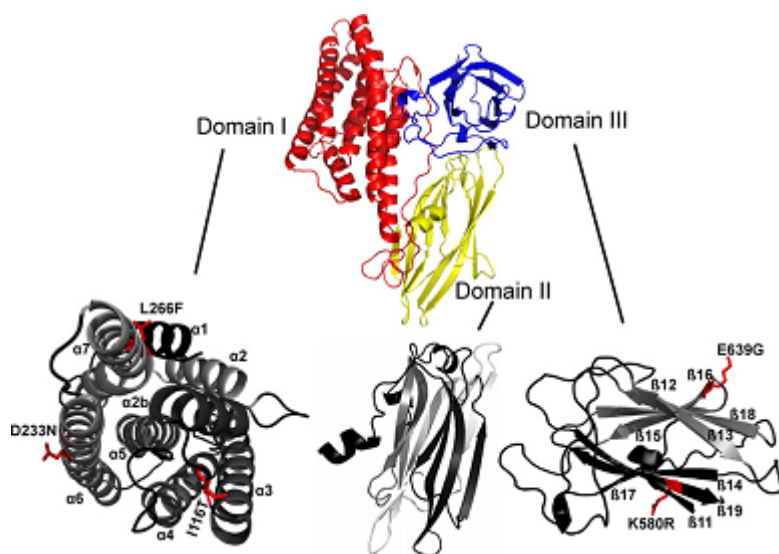


Figura 12: Estrutura terciária teórica da Cry1Ia12 e as mutações das variantes.

Em relação à mutação E639G na variante um, G639 interage unicamente com o resíduo R562 do bloco 4, através de duas ligações de hidrogênio com aproximadamente 3Å, enquanto na Cry1Ia12 original, E639 interage com Y283 do bloco 2, através de uma ligação de hidrogênio de 2.58 Å, com R562 do bloco 4 através de uma ligação de hidrogênio de 3Å, e com R637 do bloco 5 através de uma ponte salina de 3.34Å (Figura-13).

Na mutação I116T da variante três, o oxigênio da T116 interage com o CB da A120. Com relação à mutação L266F, a leucina 266 tem sua cadeia lateral voltada para os E455 (domínio 2), D270 e R262 (domínio um). E finalmente, na mutação K580R, ambos K580 e R580 estão coordenados com o N578.

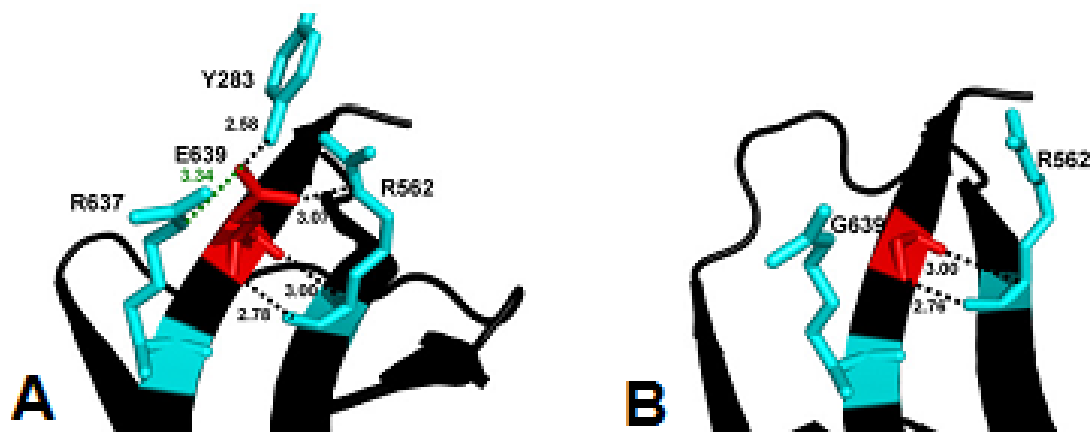


Figura 13: Representação esquemática da mutação E639G. A: Posição e distâncias entre os resíduos E639 e R637, R562 e Y283 respectivamente. B: Posicionamento do G639 da variante 1 em relação à R562.

A variante 2 contém uma única mutação D233N que acarreta uma mudança na carga líquida local pela simples troca do OD2-D233 pelo NE2-N233. Na Cry1Ia12 original a cadeia lateral da K600 está voltada para o D233, enquanto que na variante 2 a mesma cadeia lateral situa-se distante do N233 (Figura 14).

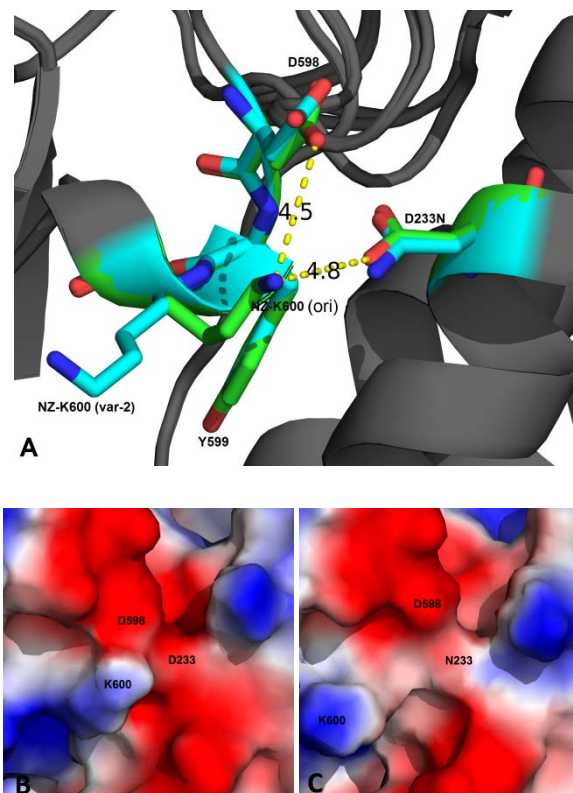


Figura 14: Representação esquemática da mutação D233N da variante 2. A: Distâncias entre NZ-K600 e OD2-D233 (4,8 Å) e NZ-K600 e OD2-D598 (4,5 Å), na Cry1Ia12 original. B: PES da Cry1Ia12 original mostrando a proximidade entre K600, D598 e D233. C: PES da Cry1Ia12-var 2 original mostrando o afastamento de K600 com N233 e D598, respectivamente.

#### 4.2. Dinâmica Molecular das Cry1Aa, Cry1Ac, Cry3Aa e Cry8Ea1.

O Desvio Quadrático Médio (RMSD) dos átomos dos sistemas foi calculado a partir das trajetórias de 50 ns tomando como referência as estruturas das respectivas proteínas a 35ps. A variação do RMSD em função do tempo fornece uma medida da convergência das propriedades estruturaisdinâmicas das proteínas. Os RMSDs variaram de 0,119 a 0,328 nm para a Cry1Aa, de 0,122 a 0,649 nm na  $\Delta\alpha 1$ -Cry1Aa, de 0,145 a 0,453 nm na Cry1Ac, de 0,148 a 0,529 nm no sistema  $\Delta\alpha 1$ -Cry1Ac, 0,125 a 0,381 nm na Cry3Aa, 0,126 a 0,475 nm na  $\Delta\alpha 1$ -Cry3Aa, 0,124 a 0,352 nm na Cry8Ea1 e 0,127 a 0,554 nm na  $\Delta\alpha 1$ -Cry8Ea1 (Figure 15).

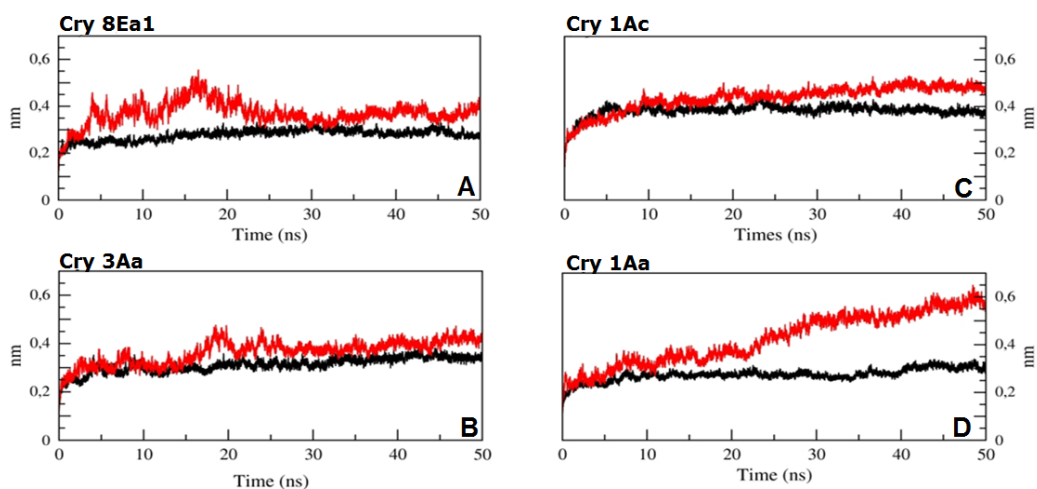


Figura 15: Desvio Quadrático Médio – RMSD (em nm) das estruturas amostradas dos sistemas toxina inteira (preto) e sistemas sem a hélice  $\alpha$ -1 (vermelho), os quais foram obtidos a partir da remoção da  $\alpha$ -1 dos arquivos PDB.

A estabilidade da estrutura globular foi analisada através dos perfis do raio de giro (Rg) ao longo das trajetórias dos oito sistemas. Os Rgs médios das toxinas foram  $2,4809 \pm 0,0150$  nm para a Cry1Aa,  $2,576 \pm 0,0156$  nm na  $\Delta\alpha$ 1-Cry1Aa;  $2,489 \pm 0,0088$  nm na Cry1Ac,  $2,508 \pm 0,015$  nm na  $\Delta\alpha$ 1-Cry1Ac,  $2,575 \pm 0,0124$  para a Cry3Aa,  $2,671 \pm 0,0213$  na  $\Delta\alpha$ 1-Cry3Aa,  $2,495 \pm 0,0090$  na Cry8Ea1 e  $2,556 \pm 0,0182$  na  $\Delta\alpha$ 1-Cry8Ea1 (Figura-16).

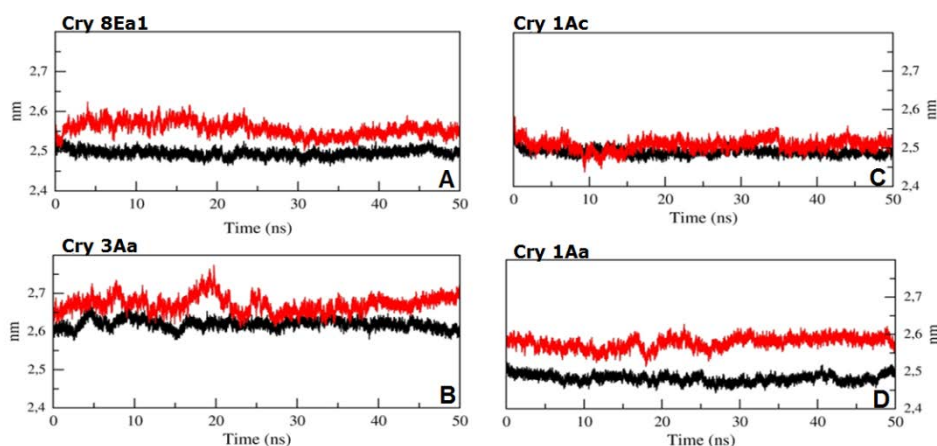


Figura 16: Raio de Giro – Rg (em nm) das estruturas dos sistemas simulados. Toxinas inteiras em preto e as estruturas sem a  $\alpha$ -1 estão representadas em vermelho.

As flutuações quadráticas médias (RMSF) calculadas para os resíduos, apresentaram perfis semelhantes para as quatro toxinas (Figura 17). Os picos das curvas correspondem às alças e as depressões correspondem às  $\alpha$ -hélices (domínio I) e fitas  $\beta$  (Domínios II e III). No domínio I, a flexibilidade maior é encontrada nas alças situadas entre as  $\alpha$ 3- $\alpha$ 4 e  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5. Nos domínios II e III as regiões mais flexíveis correspondem aos sítios de reconhecimento/ligação aos receptores ou estão próximas destes. Em todos os RMSFs tomados para os sistemas sem a  $\alpha$ 1 é possível observar um aumento da flexibilidade em todos os segmentos das curvas, com exceção dos resíduos na hélice  $\alpha$ 8 e na alça 3 da Cry1Ac (Figura 17A).

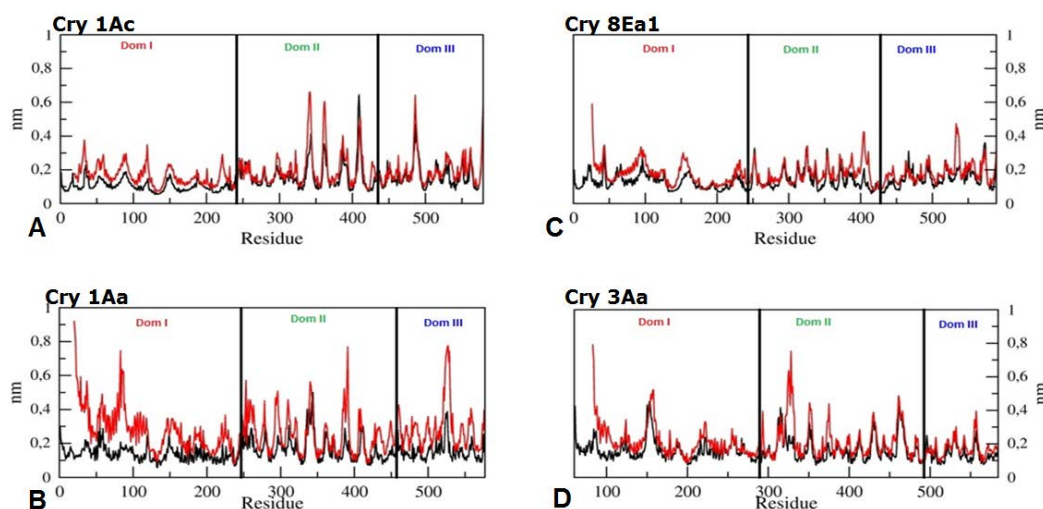


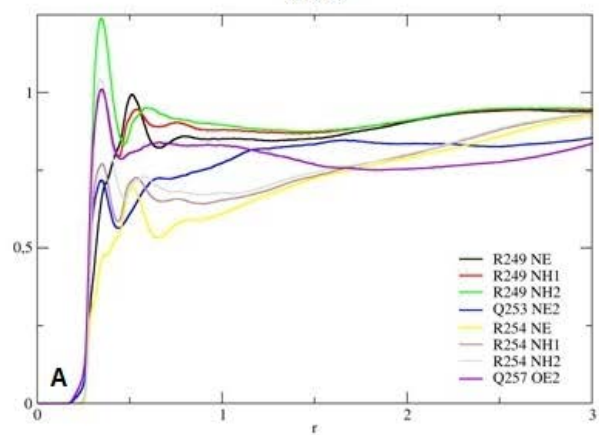
Figura 17: Flutuação Média Quadrática – RMSF das toxinas Cry. As proteínas inteiras estão representadas em preto e os sistemas sem  $\alpha$ -1 em vermelho. Os três domínios contíguos estão representados com as cores mostradas na figura 2 (Dom I, Dom II e Dom III).

A Função de Distribuição Radial (RDF) indica a variação da densidade de um átomo ou um grupo de átomos em relação a uma partícula de referência. As figuras 18 e 19 apresentam os perfis de RDF dos átomos de oxigênio e nitrogênio (cadeias laterais) dos resíduos localizados nas  $\alpha$ -8,  $\beta$ 16 e alças 2 e 3, das Cry1Aa e Cry1Ac. Os átomos NH2-R249 (Figuras 18A e 18G), OE1-Q253 (Figuras 18B e 18H) de ambas Cry1A apresentaram um perfil semelhante com os mais altos RDFs da  $\alpha$ -8. As  $\beta$ 16 das Cry1Aa e Cry1Ac possuem diferenças nas sequências, com um sítio de

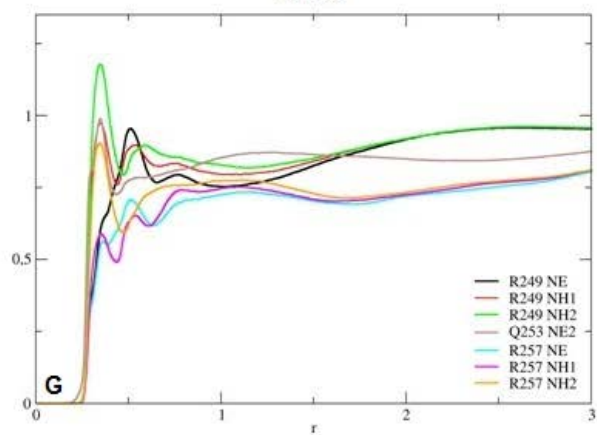


ligação ao Gal-NAc na Cry1Ac e os gráficos de RDFs (Figuras 18C, 18D, 18I e 18J) apresentam perfis distintos. Entretanto, os resíduos R511 da Cry1Aa e o R479 da Cry1Ac parecem ter um padrão semelhante de exposição ao solvente. Os resíduos da alça três (Figuras 18E, 18F e 18K) também apresentam perfis diferentes de exposição ao solvente, a exemplo do OG-S406. Na alça dois, as argininas R335 e R336 da Cry1Aa equivalem às R336 e R337 da Cry1Ac, respectivamente. Nas figuras 19A e 19C é possível observar que a R336, em ambas as toxinas Cry1A, apresentam o maior RDF. Da mesma forma, as N344 (OD1) nas duas Cry1A também apresentam perfis de RDF com valores mais elevados (Fig 19B e 19D). Os resíduos Q346 e E347 da Cry1Aa equivalem aos Q346 e Q347 da Cry1Ac e apresentam os perfis de RDF com valores menores, tanto para os nitrogênios (Fig 19A e 19C), quanto para os oxigênios (Fig 19B e 19D).

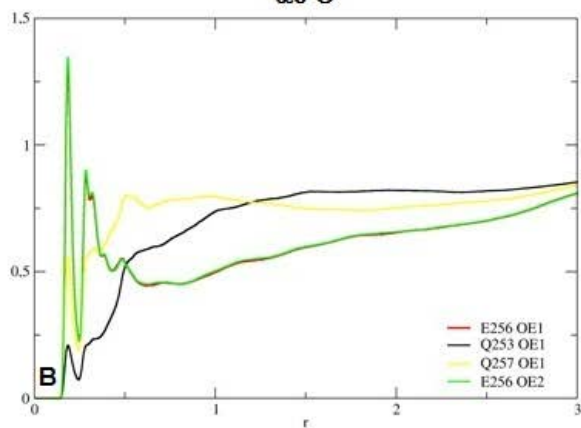
**Cry1Aa**  
 **$\alpha$ 8 N**



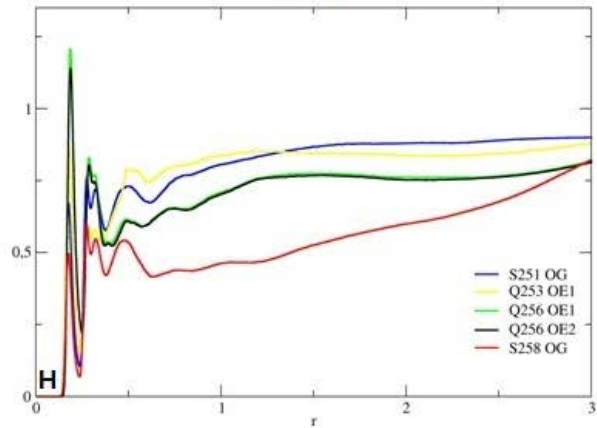
**Cry1Ac**  
 **$\alpha$ 8 N**



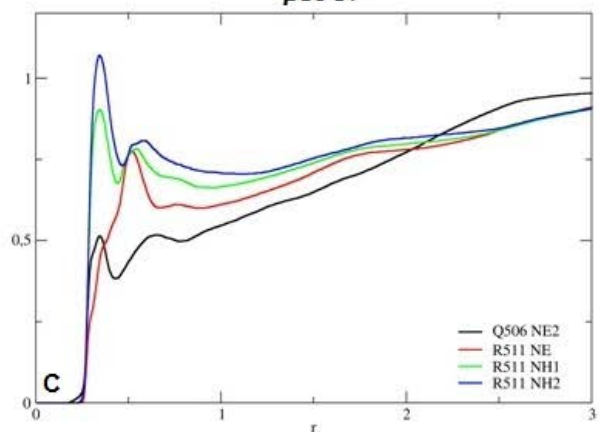
**$\alpha$ 8 O**



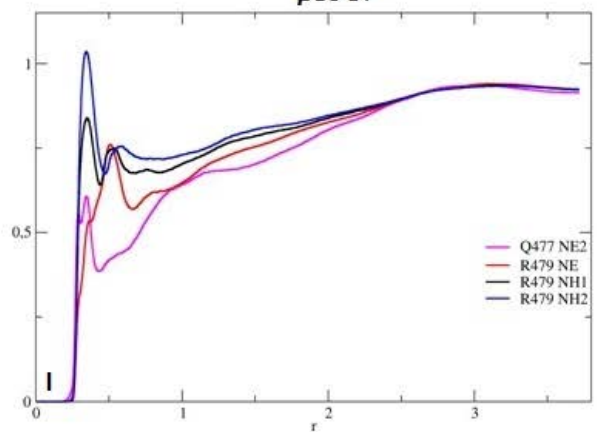
**$\alpha$ 8 O**



**$\beta$ 16 N**



**$\beta$ 16 N**



Continua na página seguinte.

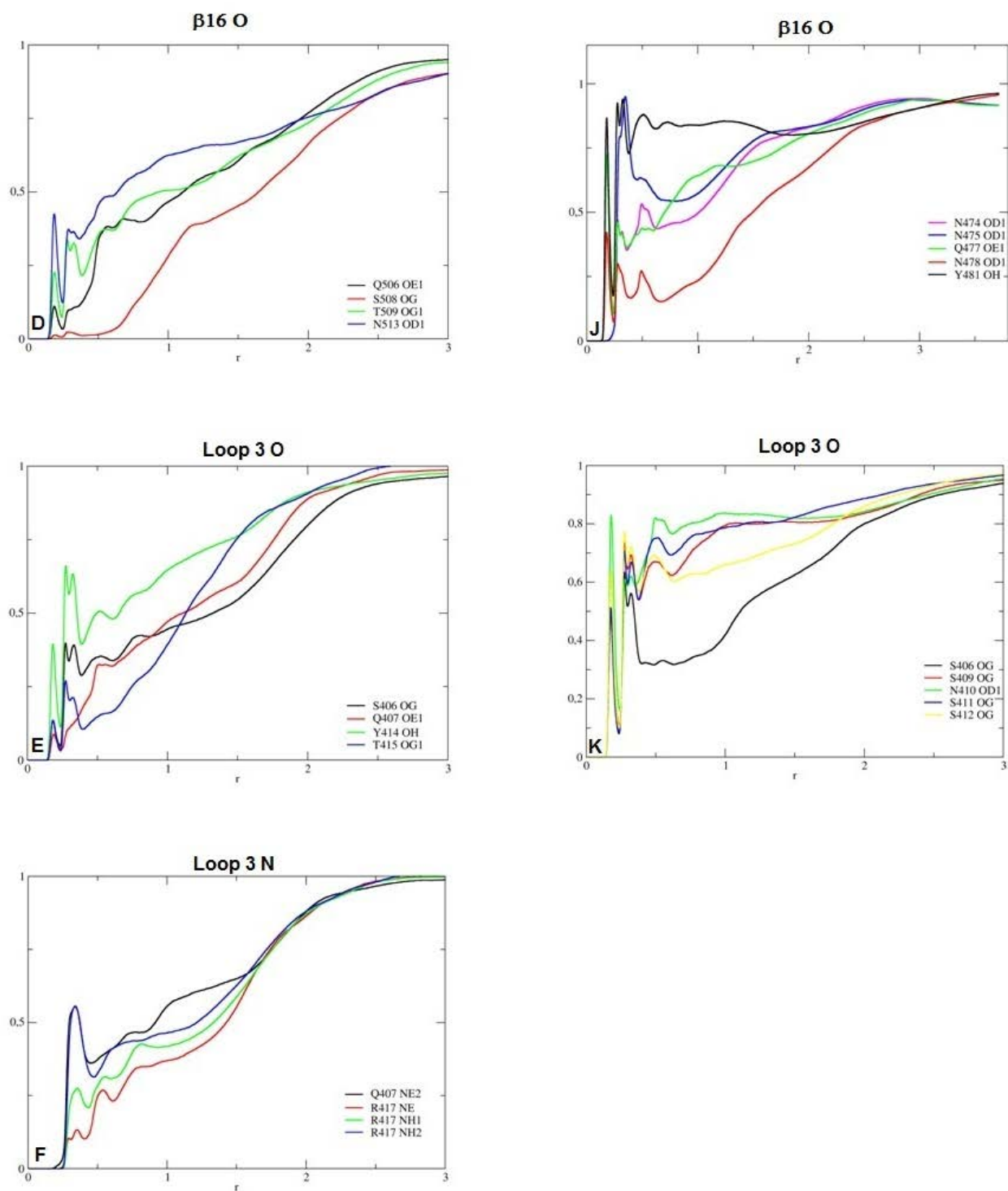


Figura 18: Função de Distribuição Radial das regiões ligantes das Cry1Aa e Cry1Ac

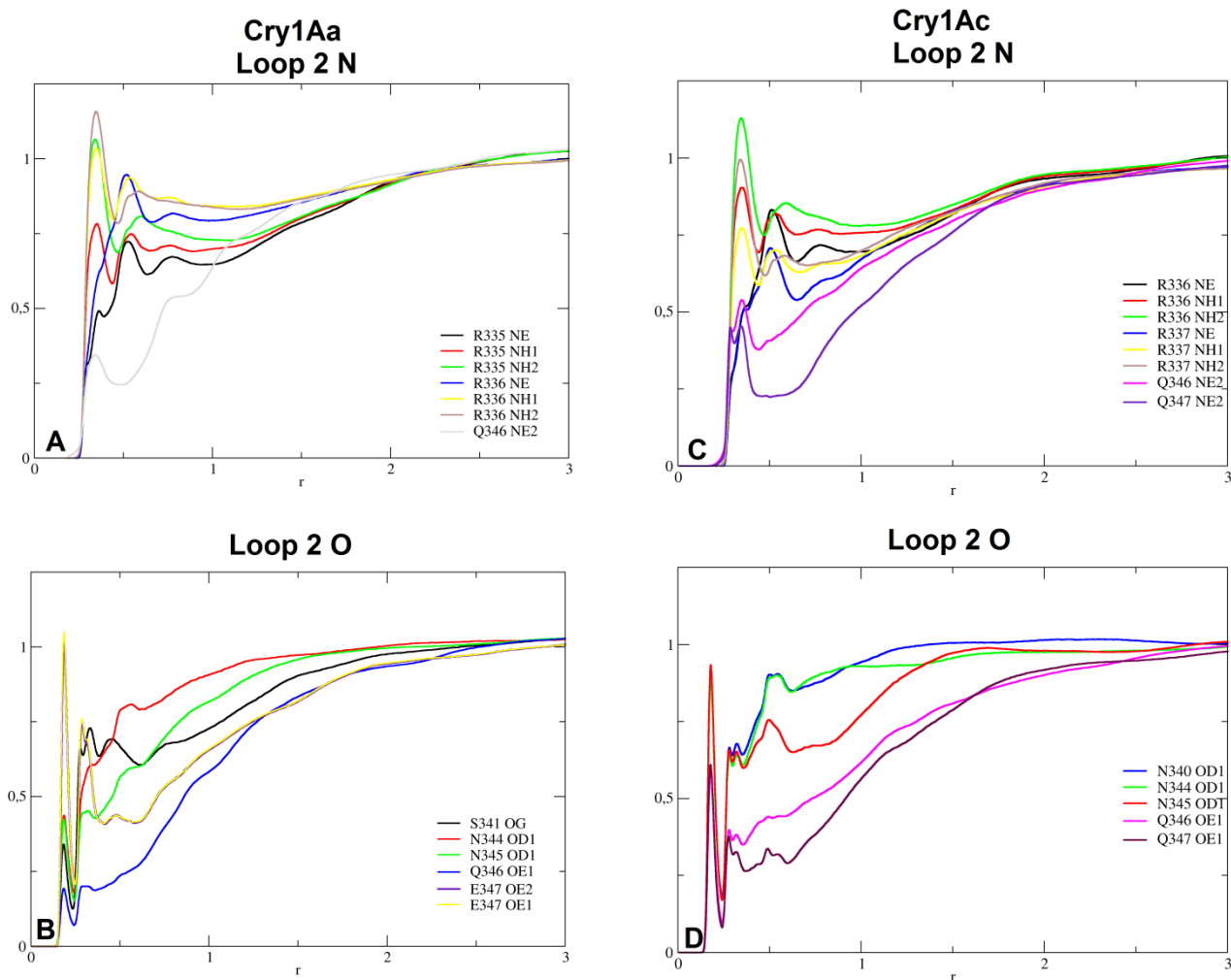


Figura 19: Função de Distribuição Radial de átomos de Oxigênio e Nitrogênio da alça 2 das Cry1Aa e Cry1Ac.

#### 4.3. Docking molecular

As estruturas das Cry1Aa e Cry1Ac obtidas ao final das simulações de DM de 50ns foram utilizadas para os cálculos de *docking* molecular com as caderinas de *Manduca sexta* (CAD-Ms) e *Helicoverpa armigera* (CAD-Ha), respectivamente. Estas duas caderinas (Figura 20), já descritas na literatura como receptores para as duas Cry1A utilizadas neste estudo, também foram modeladas tomando como molde as e-caderinas de *Xenopus laevis*. As estruturas resultantes dos *dockings* com os sítios de ligação que corresponderam ao já descrito na literatura foram escolhidas

para as análises (Figura 21). Os resíduos envolvidos nas interfaces toxina/receptor das  $\alpha$ -8,  $\beta$ 16 e alças 2 e 3, estão listados nos anexos 1 e 2.

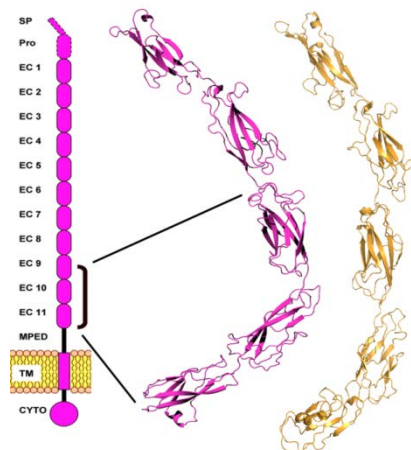


Figura 20: Caderinas de *Helicoverpa armigera* – CAD-Ha (em magenta) e *Manduca sexta* – CAD-Ms (em laranja).

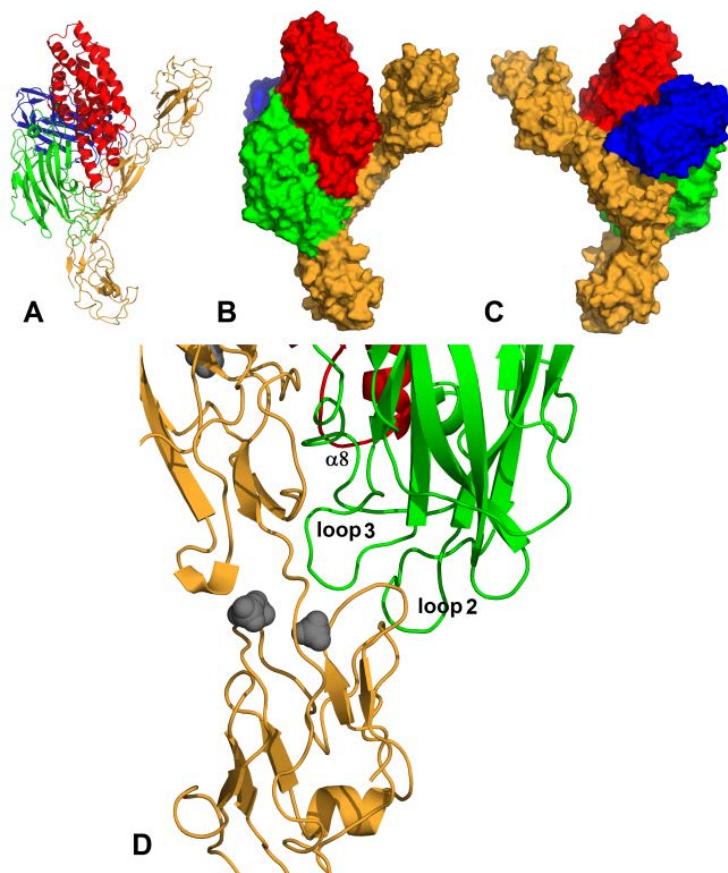


Figura 21: Representação esquemática da estrutura heterodimérica formada pelas CAD-Ms e Cry1Ab. Em D, detalhes das regiões ligantes da Cry1Ab ( $\alpha$ 8, alças 2 e 3).

## 5. Discussão

### 5.1. Análise das mutações das Cry8Ka e Cry1Ia12

#### 5.1.1. Cry8Ka5

Nenhuma das mutações presentes na Cry8Ka5 está localizada dentro das regiões de sequências conservadas, ou seja, para as duas toxinas Cry8Ka estas regiões são idênticas. E como a presença destes blocos está relacionada à estabilidade estrutural das 3D-Cry (Hofte e Whiteley 1989; Schnepf, Crickmore et al. 1998; Pigott e Ellar 2007), possivelmente as duas toxinas Cry8Ka (Cry8Ka1 e Cry8Ka5) tem o mesmo comportamento conformacional global.

Todas as estruturas cristalográficas das toxinas 3D-Cry foram obtidas a partir de toxinas ativas e, por conseguinte, clivadas nas extremidades N e C terminais. Sendo assim, os modelos obtidos para as toxinas Cry8Ka e Cry1Ia12 também não tiveram as respectivas extremidades modeladas.

Adicionalmente, foi identificada uma deleção de 16 resíduos de aminoácidos na porção N-terminal da Cry8Ka5. Contudo, esta redução no tamanho da toxina não afetou a sua atividade, uma vez que a deleção está situada antes do sítio de ativação da mesma.

A troca de uma arginina por uma glutamina na posição 82 está localizada na porção mediana da hélice  $\alpha 3$  (domínio um) e próxima dos resíduos envolvidos com a oligomerização e/ou inserção na membrana (Coux, Vachon et al. 2001; Nunez-Valdez, Sanchez et al. 2001; Vachon, Prefontaine et al. 2002; Kanintronkul, Sramala et al. 2003; Vachon, Prefontaine et al. 2004; Girard, Vachon et al. 2008; Girard, Vachon et al. 2009). Nas toxinas Cry1A, parte das argininas da  $\alpha 3$  está associada com pontes salinas intramoleculares que contribuem para a estabilidade estrutural do domínio I (Vachon, Prefontaine et al. 2002). Contudo, na Cry8Ka1 a cadeia lateral da arginina 82 está mais voltada para o solvente e estruturalmente distante de resíduos envolvidos com as possíveis pontes salinas (aspartatos ou glutamatos), o que sugere uma interação maior deste resíduo com o solvente. A Cry8Ka5, cuja toxicidade é três vezes maior que a Cry8Ka1, possui uma glutamina na posição 82 e a perda de um

resíduo carregado positivamente pode estar interferindo na interação com a membrana ou oligomerização.

Tirosinas podem ser comumente substituídas por outros aminoácidos aromáticos sem o comprometimento de função (Hanks, Quinn et al. 1988). A mutação Y260C está localizada em uma alça longa composta no total por 55 resíduos de aminoácidos e que contém a  $\alpha 8$  e outra hélice menor. Esta região hipervariável do domínio dois está diretamente envolvida com a especificidade das toxinas 3D-Cry pois é uma região de interação com os receptores do tipo caderina (Pigott e Ellar 2007; Pardo-Lopez, Soberon et al. 2012; Vachon, Laprade et al. 2012). Além disso, esta alça apresenta uma alta flexibilidade e a  $\alpha 8$  tende a perder a estrutura secundária, como observado nos sistemas simulados (Figura 17). Apesar da substituição da Y260 por uma cisteína não resultar em uma modificação acentuada na carga líquida local, a mudança estrutural decorrente das diferenças topológicas das cadeias laterais (Fig 10C e 10D) pode influenciar nas interações intermoleculares, particularmente nas que envolvem os íons de  $\text{Ca}^{+2}$  presentes nas caderinas.

De modo geral, argininas e glicinas podem estar envolvidas em ligações com grupamentos fosfato. Entretanto, a cadeia lateral da glicina confere uma maior flexibilidade às alças, quando comparada à arginina. De forma similar à Y260C, a substituição R508G acarreta mais uma mudança na superfície da proteína do que na carga líquida local. A R508 está localizada em uma região polimórfica dentro das toxinas 3D-Cry, adjacente ao bloco quatro ( $\beta 18$ ), altamente conservado entre as Cry. Este bloco é rico em argininas e tirosinas e tem sido relatado como região que interage com os receptores do tipo GPI-APN e GPI-ALP, quer seja com a participação de Gal-NAc, no caso da Cry1Ac, ou independente de glicosilações, como é o caso das demais toxinas estudadas (Pigott e Ellar 2007; Liu e Wang, 2010; Pardo-Lopez, Soberon et al. 2012). Sendo assim, mutações nesta alça podem afetar as possíveis interações com os receptores e um aumento na flexibilidade, provocado pela presença de uma glicina na posição 508 flanqueando a  $\beta 18$  (bloco 4), pode igualmente estar facilitando a ligação da toxina modificada (Cry8Ka5) com receptores de membrana do *A. grandis*.

A substituição K538E está localizada na alça situada entre os  $\beta 20$  e  $\beta 21$  do domínio 3 e se encontra voltada para o solvente. Esta mutação promove uma modificação acentuada com a troca de um resíduo carregado positivamente por outro

com carga negativa (Fig 3-G e H). Além disso, na Cry8Ka1 a K538 está estruturalmente próxima do D520, localizado na alça externa da  $\beta$ 19. Todavia, na Cry8Ka5 a lisina é substituída por um glutamato (E538) e a adição de carga negativa nesta região pode comprometer a interação com o D520 (Figura 22). Nas alças do domínio três já foram caracterizados resíduos que são importantes para a expressão máxima da toxicidade das proteínas 3D-Cry, por estarem envolvidos com a ligação aos receptores ( Gomez, Arenas et al. 2006; Xiang, Qiu et al. 2009; Liu, Wang et al. 2010). O domínio III é o menor dos três domínios das 3D-Cry e o de estrutura mais simples, com uma grande porção voltada para o solvente e, por conseguinte, propensa às interações intermoleculares, a saber, com receptores do tipo GPI-ALP (Masson, Lu et al. 1995; Arenas, Bravo et al. 2010) e com Gal-NAc (de Maagd, Bravo et al. 2003). Sendo assim, a mutação K538E pode ter modificado a afinidade pelo receptor GPI de *A. grandis* e ter contribuído para a toxicidade aumentada da Cry8Ka5 que foi aferida através dos bioensaios.

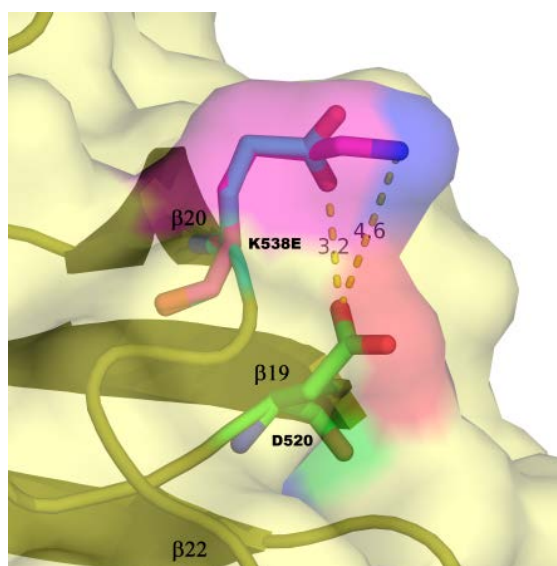


Figura 22: Detalhe do domínio 3 mostrando as distâncias entre o resíduo D520 e os resíduos da mutação: K538 e E538.

Embora não existam dados estruturais precisos descritos na literatura sobre as interações 3D-Cry e receptores de Coleoptera, tanto quanto os dados já disponíveis para Lepidoptera e Diptera, foi possível identificar a partir dos dados disponíveis para as Cry1A e Cry3Aa, as regiões da Cry8Ka5 que estão relacionadas com a toxicidade.



A partir de então, também foi possível estimar a contribuição conjunta destas mesmas mutações.

### 5.1.2. Cry1Ia12

Quatro das substituições encontradas nas variantes de Cry1Ia12 obtidas por *DNA shuffling* e *Phage Display* resultaram em trocas por resíduos apolares e as outras duas por resíduos carregados.

Adicionalmente, a maioria das mutações foi encontrada no domínio I, cuja função principal é a de oligomerização e inserção na membrana. Dean et al. (1996) realizando experimentos de mutagênese sítio dirigida com Y153D, Y153A e Y153R no domínio I da Cry1Ab demonstrou que o aspartato, como resíduo carregado negativamente é menos favorável à inserção na membrana em toxinas da família Cry1A, do que resíduos carregados positivamente, como argininas ou polares neutros, como alaninas. Girade et al. (2009) demonstraram com mutações nas  $\alpha 4$  e  $\alpha 5$  e alças adjacentes que estas regiões possuem um importante papel no mecanismo de formação de poros. Portanto, as mutações no domínio I das variantes de Cry1Ia12 podem ter uma influência na formação de poros, oligomerização e inserção na membrana de *T. l. licus*.

Neste trabalho, duas mutações foram encontradas no domínio III, o qual está associado com a proteção contra a proteólise, com reconhecimento e ligação aos receptores e regulação da formação do poro (Flores, Soberon et al. 1997). Além disso, os blocos conservados 2, 4 e 5 estão estreitamente envolvidos com a funcionalidade das toxinas (Schnepf et al., 1998). Na variante um, a mutação E639G, localizada na fita  $\beta$ -19 do domínio III está próxima de resíduos do bloco 4 (R562) e possivelmente relacionada com a estabilidade estrutural globular da toxina, e conseqüente funcionalidade do domínio.

A variante 2 contém uma única mutação D233N. O resíduo presente nesta posição, seja o D233 na Cry1Ia12 original ou o N233 na variante 2, invariavelmente apresenta a cadeia lateral voltada para o solvente. Este resíduo não pertence a

nenhuma região previamente mapeada como relevante para a expressão da toxicidade em 3D-Cry. Mas o mesmo resíduo está próximo da  $\beta$ 19, que é importante para a ligação ao receptor. A substituição encontrada na variante 2 acarreta uma mudança de carga líquida local pela simples troca de um oxigênio (OD2-D233) por um nitrogênio (NE2-N233). Na Cry1Ia12 original, os resíduos D598, Y599 e K600, da  $\beta$  19 estão próximos ao D233 (Fig-14A e 14B). Esta mudança por um aminoácido com um oxigênio a menos (N233) promove o afastamento do NZ-K600 dos OD2-D598 e N233 (Fig-14A e 14C). Como consequência, a cadeia lateral da lisina 600 fica voltada para o solvente, na variante 2 (Fig-14C), e assim, mais favorável às interações intermoleculares.

Para elucidar o papel dos resíduos D233, D598 e K600 na variante 2, novos estudos de *docking* molecular e DM com a APN de *T. I. licus* estão sendo conduzidos a fim de determinar estas interações toxina/receptor.

As três mutações que foram observadas na variante 3 parecem ter um efeito sinérgico na estrutura e conseqüente função desta variante. Na mutação I116T o oxigênio da T116 interage com o CB da A120. Este resíduo corresponde ao A92 da Cry1Ab, o qual está envolvido com a inserção na membrana (Chen et al.,2005). Com relação à mutação L266F, a leucina 266 tem sua cadeia lateral voltada para os E455 (domínio II), D270 e R262 (domínio I). Na Cry1Ia12 variante, o anel aromático da fenilalanina é menos reativo do que a L266 e pode estar interferindo nas interações entre os domínios 1 e 2. E finalmente, a mutação K580R, ambos K580 e R580 estão coordenados com o N578, que corresponde ao N546 da Cry1Ac, já relatado como importante para a ligação ao receptor (Xiang et al., 2009). Sendo a arginina mais carregada positivamente do que a lisina, esta pode estar atraindo o N578, tornando menos favorável as interações intermoleculares desta com possíveis receptores.

## 5.2. Dinâmica Molecular das Cry1Aa, Cry1Ac, Cry3Aa e Cry8Ea1.

Os RMSDs dos sistemas com as proteínas inteiras não apresentaram uma variação significativa nas quatro toxinas estudadas. Em todos os sistemas simulados sem a  $\alpha$ 1 houve um aumento nos valores médios. Além disso, as toxinas específicas

para Coleoptera (Cry3Aa e Cry8Ea1) (Figura 15A e 15B) e as Lepidoptera-específicas (Cry1Aa e Cry1Ac) (Figura 15C e 15D) apresentaram perfis de RMSD semelhantes entre si e distintos quando os dois grupos foram comparados. Este fato pode estar relacionado com propriedades conformacionais diferentes entre cada subgrupo de 3D-Cry que refletem na especificidade para os diferentes *taxa*. Os gráficos de Rg mostram uma semelhança nos perfis das quatro toxinas inteiras, mesmo com valores diferentes, como o observado para a Cry3Aa (Figura 16B, curva em preto). Entretanto, a perda da  $\alpha$ -1 parece promover modificações na estabilidade de elementos da estrutura secundária (Figura 16, curvas em vermelho). A estrutura globular das 3D-Cry e os aspectos estruturais dos três domínios já foram extensivamente discutidos na literatura, através de estudos com estruturas rígidas (Pigott e Ellar 2007; Pardo-Lopez, Soberon et al. 2012). Esta tese é o primeiro trabalho que aborda a comparação do comportamento conformacional destas toxinas em sistemas dinâmicos.

As regiões identificadas como sítios de reconhecimento/ligação aos receptores apresentaram valores maiores de RMSF nos sistemas das proteínas inteiras (Rajamohan, Hussain et al. 1996; Smedley e Ellar 1996; Chen, Brown et al. 2005; Liu, Wang et al. 2010). A flexibilidade local foi aumentada nos sistemas  $\Delta\alpha$ 1-Cry e isto pode estar relacionado com o mecanismo de ação destas toxinas. Este efeito se propaga por toda a superfície da proteína e não somente na extremidade N-terminal sugerindo o início de um processo de transição conformacional que pode estar envolvido com as interações com a membrana (ligação dos receptores e/ou inserção).

Nas toxinas do subgrupo Cry1A, as regiões  $\alpha$ -8,  $\beta$ 16, alças 2 e 3 são responsáveis pela ligação às caderinas e receptores do tipo GPI (ALP e APN) (Pacheco, Gomez et al. 2009; Bravo, Likitvivanavong et al. 2011; Likitvivanavong, Chen et al. 2011). Através da comparação dos gráficos de RDF, foi possível observar que as extremidades N-terminais das  $\alpha$ -8 e alça 2 apresentam comportamentos semelhantes quando as duas Cry1Aa e Cry1Ac foram comparadas. Em contraste, as alça 3 e  $\beta$ 16 apresentaram perfis bastante diferentes de exposição ao solvente. Os padrões de RDF observados para estas regiões podem estar relacionados com a ligação aos receptores de membrana dos insetos-alvo e, conseqüentemente, com a especificidade destas toxinas.



## 6. Conclusões

- As toxinas Cry1Aa, Cry1Ac, Cry3Aa e Cry8Ea1 apresentam padrões conformacionais semelhantes, apesar das diferenças funcionais relacionadas com a especificidade.
- A perda da  $\alpha$ -1, que *in vivo* ocorre após a ligação à caderina, promoveu nos sistemas estudados um aumento na flexibilidade local. Este efeito se propaga por toda a superfície da toxina e pode estar relacionado com as mudanças conformacionais postuladas nos modelos de ação.
- Nas toxinas do subgrupo Cry1A, as regiões identificadas como sítios de reconhecimento/ligação aos receptores ( $\alpha$ 8, alça 2, alça 3 e fita  $\beta$ 16) sofrem alterações na flexibilidade e na exposição ao solvente. Estas alterações estão relacionadas com as etapas do mecanismo de ação após a ligação à caderina, que são a ligação de maior afinidade aos receptores do tipo GPI, oligomerização e inserção na membrana.
- As mutações presentes nas toxinas Cry8Ka5 e Cry1Ia12, obtidas no LIMPP/EMBRAPA e ativas contra *A. grandis* e *T. licus licus*, contribuem para o aumento da toxicidade encontrada porque estão localizadas nos sítios de interação com os receptores ou interferem nesta interação por situarem-se próximas aos mesmos sítios.

## 7. Manuscrito a ser submetido à BMC Structural Biology

## The influence of $\alpha$ 1 withdrawal on the conformational behavior of the $\delta$ -endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis*

Wagner A. Lucena<sup>1,2</sup>; Claudia Fernandes Lemelle<sup>2</sup>; Hugo Verli<sup>2,3</sup>; Maria Fatima Grossi de Sá<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Embrapa Algodão; <sup>2</sup>PPGBCM/CBiot/UFRGS; <sup>3</sup>Faculdade de Farmácia/UFRGS; <sup>4</sup>Embrapa CENARGEN.

### Abstract

*Bacillus thuringiensis* (Bt) is a Gram-positive entomotoxic bacterium widely used in crop-pests and disease vectors control for almost 60 years. Its success relies on the production of the  $\delta$ -endotoxins (Cry). Models proposed to explain the activity of Cry proteins are based on N and C-terminal cleavages, binding to a cadherin-like receptor and conformational changes. Cry1A toxins are the most used proteins for construction of transgenic plants resistant to many crop pests. However, structural aspects of the mode of action and toxin/receptors interactions remain unclear. This study aimed to characterize the global and domains flexibilities of Cry1Ac and the influence of helix  $\alpha$ -1 deletion focusing on structural and conformational changes and the steps of the mode of action. Two systems (whole protein and helix  $\alpha$ -1 removed protein ( $\Delta\alpha$ 1)) were submitted to molecular dynamic (MD) simulations at the scale of 50 ns using the GROMACS suite and GROMOS96 force field. The data show that the global flexibility of Cry1Ac was increased by helix  $\alpha$ -1 withdrawal ( $\Delta\alpha$ 1). The local flexibility was higher in  $\Delta\alpha$ 1 system and it is also closely related with the mode of action. This effect propagates on the surface and not only on the N-termini suggesting the beginning of a complex process of conformational transition which is narrowly related with the mode of action. The Cry1Ac residues with high RMSF are the ones previously identified as recognition/binding sites (apex of domain II and domain-II/III interface) or play a role on its dynamic. The absence of helix  $\alpha$ -1 triggers structural changes mainly on the interaction motifs and expose to the solvent important residues from  $\alpha$ 5 and  $\alpha$ 7 involved with oligomerization and membrane insertion. Finally, the  $\Delta\alpha$ 1-Cry1Ac system showed a different profile of solvation from residues of loop 2.

## Introduction

*Bacillus thuringiensis* (Bt) is a gram-positive spore-forming bacterium found in soil widely spread throughout the world. It was first identified in Japan in 1901, and described again in 1915 in Thuringia [1]. Originally recognized as a pathogen of the Silkworm, several strains were also found on epizootic events in insect pests. In 1960 Bt started to be successfully used to control insect pests in agriculture and disease vectors – especially because of its specificity – which reflects directly on the safety to human health and to non-target organisms [2]. Several mass control programs of these harmful species have used Bt in bio-larvicides with different formulations as a successful alternative to the use of chemical pesticides [3, 4].

Since the introduction of transgenic plants expressing Bt genes in 1995, it has been demonstrated that Bt-crops constitute an important tool in the increase of productivity and in the decrease of the use of chemical insecticides. Nowadays, 160 million hectares are planted with biotech crops, representing an increase of 94 times of the area planted in 1996 [5], and around 35% of these Bt-crops express Cry genes, resulting in a reduction of around 8.4% in the use of chemical pesticides [6].

The success of Bt in the control of insects results from the production of toxins during the spore phase [7]. The  $\delta$ -endotoxins, as they are known, are composed of two main sub-groups: Cry and Cyt [8]. The Cry toxins compose the largest group and present specific toxicity against different insect orders (Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera and Diptera) [9, 10]. These proteins are divided in 67 sub-groups totaling more than 200 proteins, classified according to the amino acid sequence identity and the specificity of target-species [11].

The identities in the amino acid sequences range from 20 to 90% when different Cry toxins are compared [12]. However, all Cry toxins share a common globular structure formed by three continuous and contiguous domains and five blocks conserved among the sub-groups [13]. Such topologies can be observed in crystallographic (PDB ID) or modeled structures obtained and described for toxins along different sub-groups, such as Cry1Aa (1CIY) [14], Cry1Ab19 [15], Cry1Ac [16], Cry2Aa (1I5P) [17], Cry3Aa (1DLC) [18], Cry3Ba (1JI6) [19], Cry4Aa (2C9K) [20], Cry4Ba (1W99) [21], Cry5Aa [22] and Cry8Ea1 (3EB7) [23]. Domain I consists of a bundle of six amphipathic  $\alpha$ -helices and one central hydrophobic  $\alpha$ -helix being described as an important factor in the interaction with the apical membrane of the

target-insect midgut. Domain II is composed by three greek-key anti-parallel  $\beta$  sheets that form a  $\beta$ -prism – two of these are formed by 4 b-strands and the third one is formed by 3 b-strands and one short  $\alpha$ -helix ( $\alpha$  8). Domain III consists of one  $\beta$  sandwich composed by two jelly-roll topology  $\beta$  sheets [23].

The similarities in the structure and cytopathological processes caused by the intoxication with these toxins are a strong evidence that these toxins share a molecular mechanism of similar action or, at least, with some common aspects. This action mode is based on its proteolytic activation and its recognition and binding by a receptor which is present in the apical membrane of the midgut epithelium of these insects [12].

Two controversial models are the target of extensive research and aim to explain the intermediate stages between the activation and death of epithelium cells. Both models are based on experimental evidences obtained with toxins of the Cry1A sub-group. In the model of signal transduction, the activated toxin, in its monomeric form, links to a cadherin-like membrane receptor and starts a c-AMP dependent protein kinase signal transduction cascade, resulting in cellular death [24]. In the model of pore formation, a series of events for sequential binding to different membrane receptors is described, e.g. cadherin and cadherin-like (CAD) [25], GPI-anchored aminopeptidase N (APN) [26, 27] and alkaline phosphatase (ALP) [28, 29], producing conformational changes in the toxins, loss of the N-terminal end ( $\alpha$  helix 1) [30] and increasing the binding affinity of these toxins to the receptors, culminating in the oligomerization of the toxins and the formation of a pre-pore structure [25, 31]. The oligomers go into the membrane and open ion channels that promote cell lysis and subsequent death [32].

The apex of domain II is composed by the confluence of three regions:  $\alpha$  helix 8, loops 2 and 3 [14, 16]. The  $\beta$  strand 16 participates of the domain II/III interface and is reported as a Gal-NAc binding site [16, 33-36]. The loop 3 and  $\beta$ 16 are related to the binding to aminopeptidase N (APN) and alkaline phosphatase (ALK) receptors, which are related to the first step of the process of binding and conformational modifications of Cry1A toxins [37-39]. Loop 3 is also involved with the cadherin (CAD) binding step [34, 38, 40, 41].

Even though many authors have extensively reported the characterization of receptor proteins for the Cry toxins in Lepidoptera species, Coleoptera, Diptera and



other target-insects orders, as well as the identification of residues and/or toxin binding regions (TBR) in these proteins, many aspects of the mechanism of action remain unknown at the molecular level [42]. The conformational behavior in solution, the contribution of each TBR amino acid residue for the interaction with the respective receptors, the structural consequences of the loss of  $\alpha$  helix I, the oligomerization process and insertion in the membrane or even the existence of a pattern in the molecular mechanism of action for all these toxins are important questions to be answered.

This paper aims to elucidate some of these stages regarding the monomeric conformational states in solution of Cry1Ac toxin using molecular dynamics simulations and taking into account the knowledge already consolidated and the bottlenecks for the understanding of the action mode of these delta-endotoxins.

## Methods

The Cry1Ac sequence (GenBank: AAU87037.1) and the crystal structure of the  $\delta$ -endotoxin Cry 1Aa (PDB ID: 1CIY) solved at 2.25 Å were used to generate the Cry1Ac structure. Structure elucidation was performed using homology modeling approach with MODELLER 9v8 [43]. The Cry1Ac structure modelled was used as a start point for all simulations.

To study the influence of helix  $\alpha$ 1 deletion on Cry1Ac flexibility, binding sites and residues important for the oligomerization, two systems were considered: Cry1Ac (whole protein) and  $\Delta\alpha$ 1-Cry1Ac (with a deletion at P20 and lacking the  $\alpha$  helix 1). In these two cases, simulations were performed under periodic boundary conditions based on a cubic box of initial lengths 8.5 nm. The systems were solvated filling the box with simple-point-charge water molecules [44]. Counter ions ( $\text{Na}^+$ ) were used in order to neutralize the system charges.

All simulations were performed using the GROMOS96 43a1 force field [45] implemented in the 3.3.3 version of GROMACS simulations suite [46]. The systems were equilibrated in a stepwise fashion by performing successive MD runs at 50, 100, 150, 200, 250 and 310 K. Following the equilibration time, production MD runs

were carried out in the isothermal-isobaric ensemble for 50 nanoseconds (ns). The temperature was maintained at 300 K by weak coupling the solute and solvent separately to a heat bath [47] with a relaxation time of 0.1 ps. The pressure was kept at  $4.5 \times 10^5$  Pascal using weak coupling to a pressure bath [47] by isotropic coordinate scaling with relaxation time of 0.5 ps. Long-range electrostatic interactions were handled using the smooth particle mesh Ewald (SPME) method [48]. A cutoff 1.0 nm was used for the short-range non-bonded interactions (van der Waals and real-space electrostatic contribution). A 2 fs timestep was used to integrate the equations of motion based on the leapfrog algorithm [49] and trajectory frames were recorded every 0.2 ps for analysis. The PROCHECK [50], APBS [51], VMD [52] and pymol [53] programs were used in proteins analysis.

## Results

The root-mean-squared deviations (RMSD) of all proteins atoms were calculated over 50 ns trajectories taking as a reference the Cry1Ac structures at 35ps. The time evolution of the RMSD with respect to the 3D structure provides a measurement of the convergence of the dynamical properties of the protein. The RMSDs ranged from 0.145 to 0.453 nm for Cry1Ac (whole protein) and from 0.148 to 0.529 nm for  $\Delta\alpha 1$ -Cry1Ac system (Figure 1A). The stability of globular structure was analyzed comparing the radius of gyration (Rg) of the two systems. The Cry1Ac mean-Rg was  $2.489 \pm 0.0088$  nm and the Rg of  $\Delta\alpha 1$ -Cry1Ac was  $2.508 \pm 0.015$  nm (Figure 1B). The Cry1Ac and  $\Delta\alpha 1$ -Cry1Ac root-mean-square atomic positional fluctuations (RMSF) showed wide deviations when the most flexible protein portions were observed through all three domains (Figure 1C). Three segments structurally nearby for important binding sites presented a variation of RMSFs when whole and  $\alpha 1$  lacking systems were compared (picks higher than 0.3 nm in Figure 1C):  $\alpha 4$ - $\alpha 5$  loop (D88-N91),  $\alpha 7$ -loop and N386-S395 loop. In contrast, RMSFs of  $\alpha 8$  and loop 3 segments became less flexible with the cleavage of N-terminal end that includes  $\alpha 1$  (Figure 1C).

The SAS (solvent-accessible surface area) represents the area of structure that is facing and accessible to the solvent. To calculate the SAS of Cry1Ac systems it was used a 0.14 radius solvent probe and 1000 dots/sphere probe to guarantee more accuracy on the calculations. The overlap of Cry1Ac-SAS (black line) and  $\Delta\alpha$ 1-Cry1Ac-SAS (red line) profiles shows three important peaks with an improvement of area accessible: D142 ( $\alpha$ 5), E203-D219 ( $\alpha$ 7) and H278 (close to loop 2) (Figure 1D).

The Radial Distribution Function (RDF) indicates the density variation of an atom or group of atoms as function of a reference particle. Figure 2 (A and E) shows the atoms NH2-R249 ( $\alpha$ -8) and OD1-N410 (loop 3) with high RDFs as well as Figure 3C shows NH2-R336 (loop 2; black line), all of them for Cry1Ac whole-toxin system. In addition, Figure 2C showed R479 (red, black and blue lines) and Figure 2D, Y481 (black line) as most solvent exposed residues of strand  $\beta$ 16, which is a segment that interacts with GPI-anchor membrane receptors of Cry1Ac target-insects. There is a change on Q346 and Q347 profiles for nitrogen (N) (Figure 3J and 3L) and oxygen (O) (Figure 3K and 3M) when the two systems are compared.

## Discussion

Although the deviation from the reference structure had no significantly variation, the Rg profile was quite different between the two systems pointing out that the global flexibility of Cry 1Ac toxin changed by  $\alpha$ -1 helix withdrawal ( $\Delta\alpha$ 1) leading to modifications on the stability of the secondary structure elements.

The Cry 1Ac (whole protein) residues with higher RMSF values are at the same regions identified as recognition/binding sites (apex of domain II and domain-II/III interface) for the lepidopteran receptors already described on literature or play a role on its dynamic [28, 36, 40, 54]. The high local flexibility found along the Cry1Ac trajectory may be explained by the close relation between these epitopes and the toxin-binding-regions (TBRs) of receptors and their role on the mode of action. The local flexibility was higher in  $\Delta\alpha$ 1-Cry1Ac system when compared to whole-protein system and it is also related with the mode of action. This effect propagates on the surface and not only on the N-termini suggesting the beginning of a complex process

of conformational transition which is closely related with the molecular mechanism of action. The lack of flexibility of  $\alpha 8$  and loop 3 in  $\Delta\alpha 1$ -Cry1Ac system can be related with the fact that these regions interact with CAD receptors and not APN and ALK or even oligomerization of Cry1A toxins. Loop 2 and  $\beta$ -16 increased the RMSF when whole-protein and  $\alpha 1$ -lacking systems are compared. On the other hand, loop 2 is important as far to CAD binding as pre-pore structure formation. So this is why loop 2 both remains flexible and improves RMSF even after the  $\alpha 1$  cleavage [12, 39, 55].

According to the pore-formation model,  $\alpha 5$  is a key-player structure for oligomerization [30, 56-59]. D142 ( $\alpha 5$ ) is a 6 Å distant residue to the  $\alpha$ -1 cleavage point (P20) and also structurally close to the very flexible  $\alpha 4$ - $\alpha 5$  loop (D88-N91), meaning the influence of  $\alpha$ -1 cleavage under the local flexibility and solvation of this region and its probable contribution to oligomerization.

Considering that  $\alpha$ -8, loop 2 and loop 3 are responsible for the CAD binding step of mode of action of Cry1A toxins, and comparing all RDF graphics for these regions, we concluded that NH2-R249 ( $\alpha$ -8), OD1-N410 (loop 3) and NH2-R336 are possibly atoms with contributions on Cry1A/CAD interactions.

The whole-protein system (Figure 3; black lines) represents a Cry1Ac monomeric before the cleavage of  $\alpha 1$  and the  $\Delta\alpha 1$ -Cry1Ac (Figure 3; red lines) system represents the same toxin just after the helix removal. Jenkins and cols., 1999 [60] demonstrated that strand  $\beta 16$  (domain III) contributes to the interaction between *Manduca sexta* APN and Cry1A toxins, focusing on the QNR motif. Based on these data, we pointed out that tyrosine 481 and arginine 479 of Cry1Ac could be two important amino acids for the toxin/GPI-anchor receptor binding at the beginning of Cry1A/brush border membrane interactions. The low RDF values observed in N478 and Q477 are due to the fact that these residues present the side chains facing to the core of the domain III through all trajectories (data no shown).

The binding of CAD receptor leads to the exposure of the domain II apex from the Cry1A toxins and further proteolytic cleavage of  $\alpha$ -1. Thereafter, Cry1A toxins form an oligomeric structure with an improvement of binding affinity for GPI-anchor receptors, mainly by interaction with loop 2 (Domain II) [39]. The contribution of each residue from loop 2 on the step after CAD binding and  $\alpha$ -1 removal was analyzed by comparison of RDFs profiles (Figure 3). Q346 and Q347 profiles for nitrogen (Figures

3J and 3L) and for oxygen (Figures 3K and 3M) suggest the influence of  $\alpha$ -1 withdrawal over these residues and its consequence on GPI-anchor receptors linkage that occurs after the oligomerization.

Through the analysis of trajectories it was possible to identify R249 ( $\alpha$ 8), N410 (loop 3), R336 (loop 2), R279 and Y481 ( $\beta$ 16) as important residues for membrane receptors (CAD and GPI-anchor ALK and APN) interactions before  $\alpha$ 1 removal and oligomerization. Similarly, it was possible to verify that the  $\alpha$ 1 cleavage maybe induces oligomerization by modifications on secondary structure conformation of  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5 loop and  $\alpha$ 7. After the deletion of  $\alpha$ 1, Q346 and Q347 became more exposed to the solvent and they probably play a role on the high binding affinity interaction with membrane. Finally, the removal of  $\alpha$ -1 increase the solvent exposition of regions involved with oligomerization ( $\alpha$ 5 and  $\alpha$ 7) (Figures 1D and 4).

## References

1. Berliner E: **Über die Schlafsucht der Mehlmotte Raupe (*Ephestia kuehniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis***. *Z angew Ent* 1915, **2**:29.
2. Navon A, Klein M, Braun S: ***Bacillus thuringiensis* potency bioassays against *Heliothis armigera*, *Earias insulana*, and *Spodoptera littoralis* larvae based on standardized diets**. *Journal of invertebrate pathology* 1990, **55**(3):387-393.
3. Kumar S, Chandra A, Pandey KC: ***Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: an environment friendly insect-pest management strategy**. *J Environ Biol* 2008, **29**(5):641-653.
4. Van Rie J: ***Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control technologies**. *Int J Med Microbiol* 2000, **290**(4-5):463-469.
5. C. J: **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011**. *ISAAA Brief N° 42 Ithaca, NY: ISAAA* 2010.
6. Brookes G, Barfoot P: **GM crops: global socio-economic and environmental impacts 1996-2008**. *PG Economics Ltd, UK* 2010.
7. Agaisse H, Lereclus D: **Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* cryIII<sub>A</sub> toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a spo0A mutant**. *J Bacteriol* 1994, **176**(15):4734-4741.
8. de Maagd RA, Bravo A, Crickmore N: **How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world**. *Trends Genet* 2001, **17**(4):193-199.
9. Delecluse A, Bourgouin C, Klier A, Rapoport G: **Specificity of action on mosquito larvae of *Bacillus thuringiensis israelensis* toxins encoded by two different genes**. *Mol Gen Genet* 1988, **214**(1):42-47.
10. van Frankenhuyzen K: **Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins**. *Journal of invertebrate pathology* 2009, **101**(1):1-16.
11. Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean DH: **Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins**. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 1998, **62**(3):807-813.
12. Pigott CR, Ellar DJ: **Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity**. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 2007, **71**(2):255-281.
13. Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH: ***Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins**. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 1998, **62**(3):775-806.
14. Grochulski P, Masson L, Borisova S, Pusztai-Carey M, Schwartz JL, Brousseau R, Cygler M: ***Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation**. *Journal of molecular biology* 1995, **254**(3):447-464.
15. Kashyap S, Singh BD, Amla DV: **Computational tridimensional protein modeling of Cry1Ab19 toxin from *Bacillus thuringiensis* BtX-2**. *J Microbiol Biotechnol* 2012, **22**(6):788-792.
16. Derbyshire DJ, Ellar DJ, Li J: **Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine**. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2001, **57**(Pt 12):1938-1944.
17. Morse RJ, Yamamoto T, Stroud RM: **Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope**. *Structure* 2001, **9**(5):409-417.
18. Li JD, Carroll J, Ellar DJ: **Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution**. *Nature* 1991, **353**(6347):815-821.

19. Galitsky N, Cody V, Wojtczak A, Ghosh D, Luft JR, Pangborn W, English L: **Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis***. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2001, **57**(Pt 8):1101-1109.
20. Boonserm P, Mo M, Angsuthanasombat C, Lescar J: **Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution**. *J Bacteriol* 2006, **188**(9):3391-3401.
21. Boonserm P, Davis P, Ellar DJ, Li J: **Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications**. *Journal of molecular biology* 2005, **348**(2):363-382.
22. Xin-Min Z, Li-Qiu X, Xue-Zhi D, Fa-Xiang W: **The theoretical three-dimensional structure of *Bacillus thuringiensis* Cry5Aa and its biological implications**. *Protein J* 2009, **28**(2):104-110.
23. Guo S, Ye S, Liu Y, Wei L, Xue J, Wu H, Song F, Zhang J, Wu X, Huang D *et al*: **Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela***. *J Struct Biol* 2009, **168**(2):259-266.
24. Zhang X, Candas M, Griko NB, Taussig R, Bulla LA, Jr.: **A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis***. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(26):9897-9902.
25. Bravo A, Gomez I, Conde J, Munoz-Garay C, Sanchez J, Miranda R, Zhuang M, Gill SS, Soberon M: **Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains**. *Biochim Biophys Acta* 2004, **1667**(1):38-46.
26. Denolf P, Hendrickx K, Van Damme J, Jansens S, Peferoen M, Degheele D, Van Rie J: **Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins**. *Eur J Biochem* 1997, **248**(3):748-761.
27. Hua G, Tsukamoto K, Rasilo ML, Ikezawa H: **Molecular cloning of a GPI-anchored aminopeptidase N from *Bombyx mori* midgut: a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA toxin**. *Gene* 1998, **214**(1-2):177-185.
28. Chen J, Brown MR, Hua G, Adang MJ: **Comparison of the localization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A delta-endotoxins and their binding proteins in larval midgut of tobacco hornworm, *Manduca sexta***. *Cell Tissue Res* 2005, **321**(1):123-129.
29. Likitvivatanavong S, Chen JW, Evans AM, Bravo A, Soberon M, Gill SS: **Multiple Receptors as Targets of Cry Toxins in Mosquitoes**. *J Agr Food Chem* 2011, **59**(7):2829-2838.
30. Gomez I, Sanchez J, Miranda R, Bravo A, Soberon M: **Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin**. *FEBS Lett* 2002, **513**(2-3):242-246.
31. Soberon M, Fernandez LE, Perez C, Gill SS, Bravo A: **Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins**. *Toxicon* 2007, **49**(5):597-600.
32. Escriche B, De Decker N, Van Rie J, Jansens S, Van Kerkhove E: **Changes in Permeability of Brush Border Membrane Vesicles from *Spodoptera littoralis* Midgut Induced by Insecticidal Crystal Proteins from *Bacillus thuringiensis***. *Appl Environ Microbiol* 1998, **64**(4):1563-1565.
33. Burton SL, Ellar DJ, Li J, Derbyshire DJ: **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* 1999, **287**(5):1011-1022.

34. Gomez I, Arenas I, Benitez I, Miranda-Rios J, Becerril B, Grande R, Almagro JC, Bravo A, Soberon M: **Specific epitopes of domains II and III of Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in Manduca sexta.** *J Biol Chem* 2006, **281**(45):34032-34039.
35. Xiang WF, Qiu XL, Zhi DX, Min ZX, Yuan L, Quan YZ: **N546 in beta18-beta19 loop is important for binding and toxicity of the Bacillus thuringiensis Cry1Ac toxin.** *Journal of invertebrate pathology* 2009, **101**(2):119-123.
36. Liu YL, Wang QY, Wang FX, Ding XZ, Xia LQ: **Residue 544 in domain III of the Bacillus thuringiensis Cry1Ac toxin is involved in protein structure stability.** *Protein J* 2010, **29**(6):440-444.
37. Luke Masson (1), Yang-jiang Lu (2), Alberto Mazza (1), Roland Brousseau (1), Michael J. Adang (2): **The CryIA(c) Receptor Purified from Manduca sexta Displays Multiple Specificities.** 1995, **270**(35):20309-20315.
38. Pacheco S, Gomez I, Arenas I, Saab-Rincon G, Rodriguez-Almazan C, Gill SS, Bravo A, Soberon M: **Domain II loop 3 of Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin is involved in a "ping pong" binding mechanism with Manduca sexta aminopeptidase-N and cadherin receptors.** *J Biol Chem* 2009, **284**(47):32750-32757.
39. Arenas I, Bravo A, Soberon M, Gomez I: **Role of alkaline phosphatase from Manduca sexta in the mechanism of action of Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin.** *J Biol Chem* 2010, **285**(17):12497-12503.
40. Rajamohan F, Hussain SR, Cotrill JA, Gould F, Dean DH: **Mutations at domain II, loop 3, of Bacillus thuringiensis CryIAa and CryIAb delta-endotoxins suggest loop 3 is involved in initial binding to lepidopteran midguts.** *J Biol Chem* 1996, **271**(41):25220-25226.
41. Likitvivatanavong S, Chen J, Bravo A, Soberon M, Gill SS: **Cadherin, alkaline phosphatase, and aminopeptidase N as receptors of Cry11Ba toxin from Bacillus thuringiensis subsp. jegathesan in Aedes aegypti.** *Appl Environ Microbiol* 2011, **77**(1):24-31.
42. Vachon V, Laprade R, Schwartz JL: **Current models of the mode of action of Bacillus thuringiensis insecticidal crystal proteins: A critical review.** *Journal of invertebrate pathology* 2012.
43. Sali A, Potterton L, Yuan F, van Vlijmen H, Karplus M: **Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER.** *Proteins* 1995, **23**(3):318-326.
44. H. J. C. Berendsen JPMP, W. F. van Gunsteren, and J. Hermans,: **Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration.** *Intermolecular Forces* 1981.
45. Scott WRP, Hunenberger PH, Tironi IG, Mark AE, Billeter SR, Fennen J, Torda AE, Huber T, Kruger P, van Gunsteren WF: **The GROMOS biomolecular simulation program package.** *J Phys Chem A* 1999, **103**(19):3596-3607.
46. Van der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC: **GROMACS: Fast, flexible, and free.** *J Comput Chem* 2005, **26**(16):1701-1718.
47. Berendsen HJC, Postma JPM, Vangunsteren WF, Dinola A, Haak JR: **Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath.** *J Chem Phys* 1984, **81**(8):3684-3690.
48. Ulrich Essmann LP, and Max L. Berkowitz: **A smooth particle mesh Ewald method.** *J Chem Phys* 1995, **103**(19):8577.
49. HOCKNEY RW: **The potential calculation and some applications.** *Methods of Computational Physics* 1969:136-211.



50. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM: **PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures.** *Journal of Applied Crystallography* 1993, **26**(2):283-291.
51. Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA: **Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(18):10037-10041.
52. Humphrey W, Dalke A, Schulten K: **VMD: visual molecular dynamics.** *Journal of molecular graphics* 1996, **14**(1):33-38, 27-38.
53. Schrodinger L: **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4.** 2010.
54. Smedley DP, Ellar DJ: **Mutagenesis of three surface-exposed loops of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin reveals residues important for toxicity, receptor recognition and possibly membrane insertion.** *Microbiology* 1996, **142** ( Pt 7):1617-1624.
55. Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberon M: ***Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide.** *Insect biochemistry and molecular biology* 2011, **41**(7):423-431.
56. Gazit E, Shai Y: **The assembly and organization of the alpha 5 and alpha 7 helices from the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Relevance to a functional model.** *J Biol Chem* 1995, **270**(6):2571-2578.
57. Nunez-Valdez M, Sanchez J, Lina L, Guereca L, Bravo A: **Structural and functional studies of alpha-helix 5 region from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin.** *Biochim Biophys Acta* 2001, **1546**(1):122-131.
58. Kanintronkul Y, Sramala I, Katzenmeier G, Panyim S, Angsuthanasombat C: **Specific mutations within the alpha4-alpha5 loop of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B toxin reveal a crucial role for Asn-166 and Tyr-170.** *Mol Biotechnol* 2003, **24**(1):11-20.
59. Krittanai C, Bourchookarn A, Pathaichindachote W, Panyim S: **Mutation of the hydrophobic residue on helix alpha5 of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B affects structural stability.** *Protein Pept Lett* 2003, **10**(4):361-368.
60. Jenkins JL, Lee MK, Sangadala S, Adang MJ, Dean DH: **Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin to *Manduca sexta* aminopeptidase-N receptor is not directly related to toxicity.** *FEBS Lett* 1999, **462**(3):373-376.

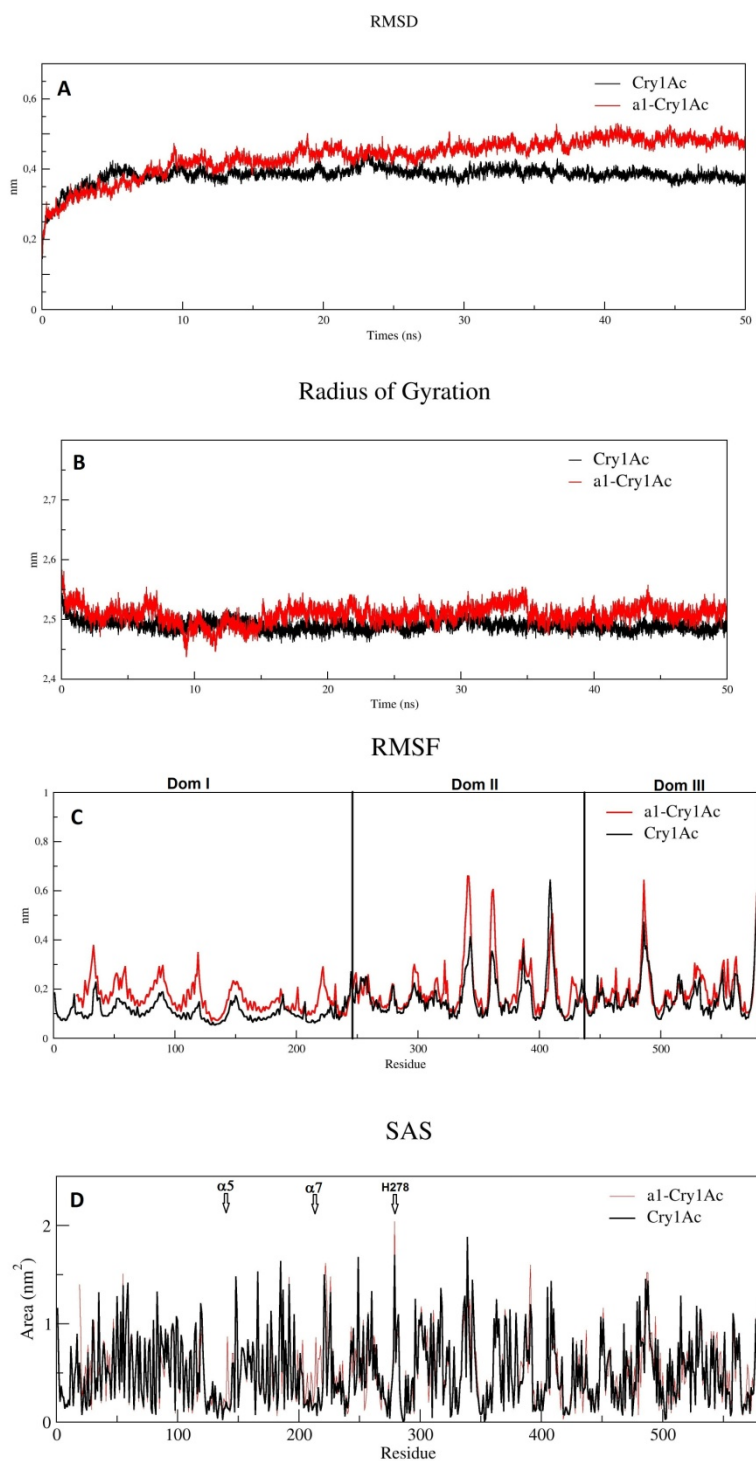


Figure 1: Global and local flexibilities and solvent-accessible surface of Cry1Ac and  $\Delta\alpha 1$ -Cry1Ac systems. A: Root-mean-squared deviation; RMSD. B: Radius of gyration; Rg. C: Root-mean-square atomic positional fluctuations; RMSF. D: solvent-accessible surface area; SAS.

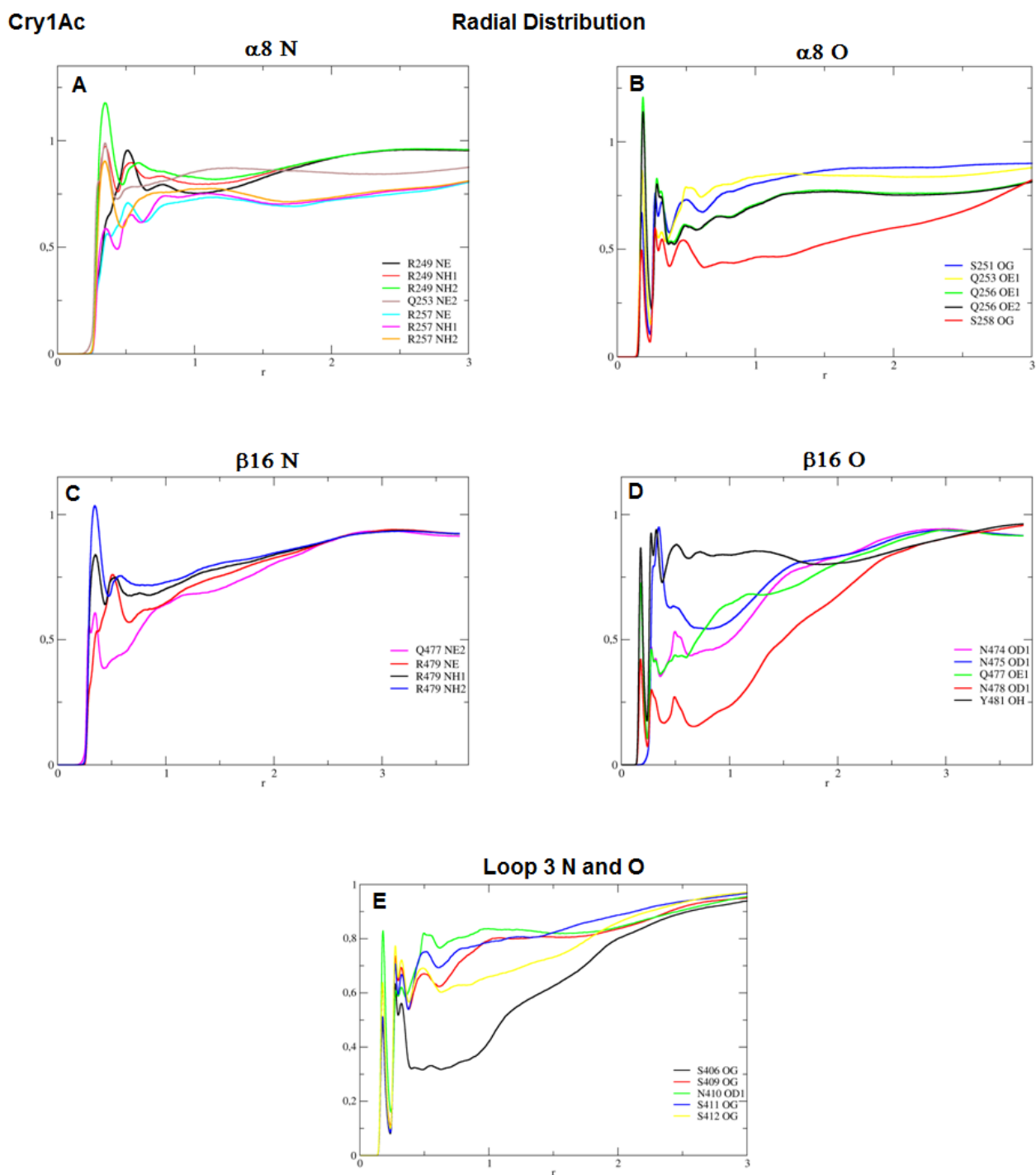


Figure 2: Radial distribution function (RDF) of Cry1Ac (whole-protein) receptor-binding residues. Alpha helix 8 nitrogen (A) and oxygen (B), Beta strands 16 nitrogen (C) and oxygen (D) and loop 3 nitrogen and oxygen (E).

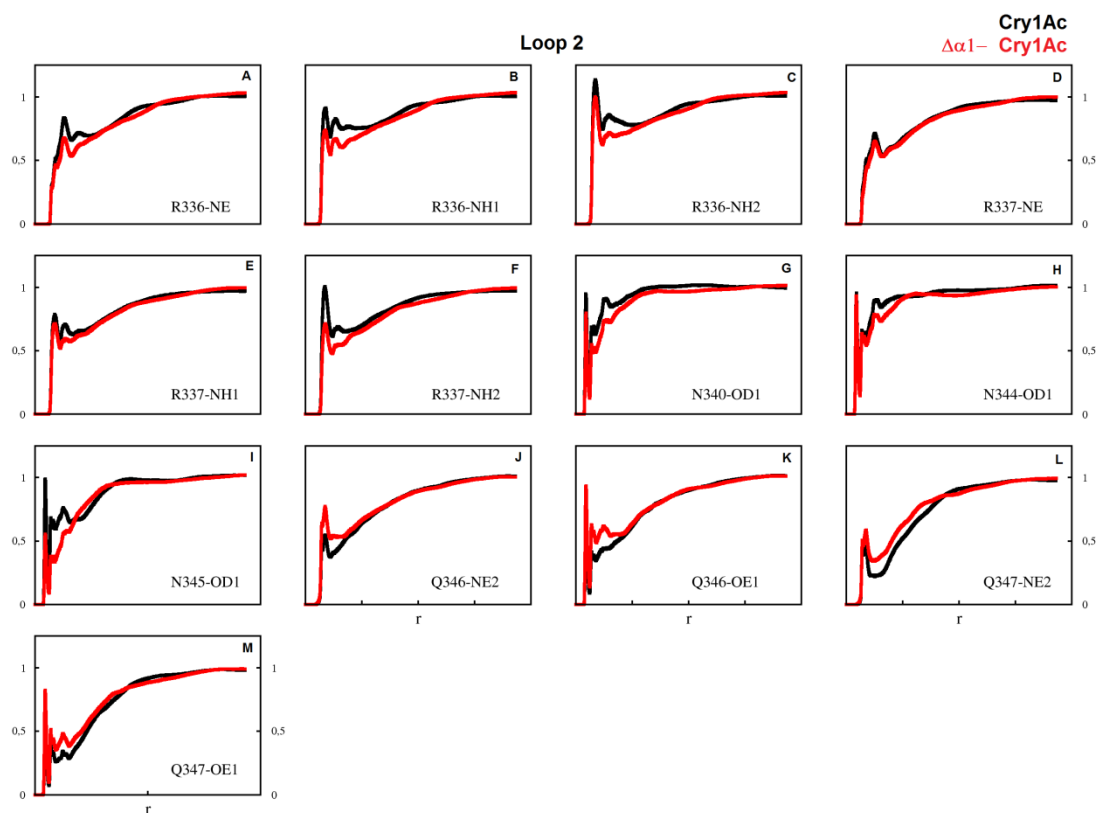


Figure 3: Radial distribution function (RDF) of loop 2 reactive residues. Cry1Ac whole-protein (black lines) and  $\Delta\alpha 1$ -Cry1Ac (red lines).

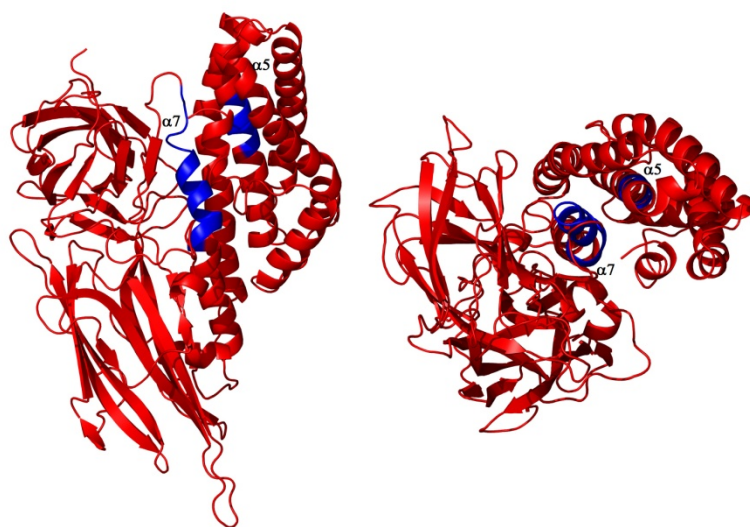


Figure 4: Ribbon representation of  $\Delta\alpha 1$ -Cry1Ac showing  $\alpha 5$  and  $\alpha 7$ .

## 8. Perspectivas

Os resultados obtidos na presente tese compõem o primeiro estudo comparativo das propriedades estruturais das toxinas Cry. O conhecimento acumulado ao longo deste período possibilitou o entendimento deste comportamento dinâmico.

Como consequência do trabalho realizado nesta tese, já está em andamento no LIMPP:

-Cálculos de *Docking* Molecular e Simulações de DM com três Cry1A e os respectivos receptores-modelo.

-Modelagem por homologia das APNs de *Manduca sexta*, *Bombyx mori* e *Telchin licus licus* e posterior *docking* e DM com as Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1Ia12.

## 9. Referências Bibliográficas

- Abdullah, M. A., A. P. Valaitis, et al. (2006). "Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*." BMC Biochem **7**: 16.
- Adams, J. C. and P. A. Hartman (1965). "Longevity of *Bacillus thuringiensis* Berliner in the rumen." J Invertebr Pathol **7**(2): 245-247.
- Alcantara, E. P., O. Alzate, et al. (2001). "Role of alpha-helix seven of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin in membrane insertion, structural stability, and ion channel activity." Biochemistry **40**(8): 2540-2547.
- Alzate, O., T. You, et al. (2006). "Effects of disulfide bridges in domain I of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa delta-endotoxin on ion-channel formation in biological membranes." Biochemistry **45**(45): 13597-13605.
- Angelucci, C., G. A. Barrett-Wilt, et al. (2008). "Diversity of aminopeptidases, derived from four lepidopteran gene duplications, and polycalins expressed in the midgut of *Helicoverpa armigera*: identification of proteins binding the delta-endotoxin, Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis*." Insect Biochem Mol Biol **38**(7): 685-696.
- Angst, B. D., C. Marcozzi, et al. (2001). "The cadherin superfamily: diversity in form and function." J Cell Sci **114**(Pt 4): 629-641.
- Araujo-Coutinho, C. J. and L. A. Lacey (1990). "Field evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis for control of black flies in the North Littoral Zone of Brazil's Sao Paulo State." Bull Pan Am Health Organ **24**(3): 307-313.
- Arenas, I., A. Bravo, et al. (2010). "Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin." J Biol Chem **285**(17): 12497-12503.
- Atsumi, S., Y. Inoue, et al. (2008). "Location of the *Bombyx mori* 175kDa cadherin-like protein-binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin." FEBS J **275**(19): 4913-4926.
- Banks, D. J., G. Hua, et al. (2003). "Cloning of a *Heliothis virescens* 110 kDa aminopeptidase N and expression in *Drosophila* S2 cells." Insect Biochem Mol Biol **33**(5): 499-508.
- Banks, D. J., J. L. Jurat-Fuentes, et al. (2001). "*Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry1Fa delta-endotoxin binding to a novel 110 kDa aminopeptidase in *Heliothis virescens* is not N-acetylgalactosamine mediated." Insect Biochem Mol Biol **31**(9): 909-918.
- Barton, K. A., H. R. Whiteley, et al. (1987). "*Bacillus thuringiensis* section sign-Endotoxin Expressed in Transgenic *Nicotiana tabacum* Provides Resistance to Lepidopteran Insects." Plant Physiol **85**(4): 1103-1109.
- Berendsen, H. J. C., J. P. M. Postma, et al. (1984). "Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath." Journal of Chemical Physics **81**(8): 3684-3690.
- Berendsen, H. J. C.; Grigera, J. R.; Straatsma, T. P.: The missing term in effective pair potentials. J. Phys. Chem., **1987**, *91*, 6269-6271.
- Berry, C., S. O'Neil, et al. (2002). "Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis." Appl Environ Microbiol **68**(10): 5082-5095.
- Betz, F. S., B. G. Hammond, et al. (2000). "Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests." Regul Toxicol Pharmacol **32**(2): 156-173.
- Boonserm, P., M. Mo, et al. (2006). "Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution." J Bacteriol **188**(9): 3391-3401.
- Boonserm, P., P. Davis, et al. (2005). "Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications." J Mol Biol **348**(2): 363-382.
- Bourgouin, C., A. Klier, et al. (1986). "Characterization of the genes encoding the haemolytic toxin and the mosquitocidal delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* israelensis." Mol Gen Genet **205**(3): 390-397.
- Bravo, A. (1997). "Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains." J Bacteriol **179**(9): 2793-2801.
- Bravo, A., I. Gomez, et al. (2004). "Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains." Biochim Biophys Acta **1667**(1): 38-46.
- Bravo, A., I. Gomez, et al. (2012). "Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity." Microb Biotechnol.

- Bravo, A., S. Likitvivanavong, et al. (2011). "Bacillus thuringiensis: A story of a successful bioinsecticide." *Insect Biochem Mol Biol* **41**(7): 423-431.
- Bravo, A., S. S. Gill, et al. (2007). "Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control." *Toxicon* **49**(4): 423-435.
- Budatha, M., G. Meur, et al. (2007). "Characterization of Bacillus thuringiensis Cry toxin binding novel GPI anchored aminopeptidase from fat body of the moth Spodoptera litura." *Biotechnol Lett* **29**(11): 1651-1657.
- Buzdin, A. A., L. P. Revina, et al. (2002). "Interaction of 65- and 62-kD proteins from the apical membranes of the Aedes aegypti larvae midgut epithelium with Cry4B and Cry11A endotoxins of Bacillus thuringiensis." *Biochemistry (Mosc)* **67**(5): 540-546.
- Case, D. A., T. E. Cheatham, 3rd, et al. (2005). "The Amber biomolecular simulation programs." *Journal of Computational Chemistry* **26**(16): 1668-1688.
- Chapman, J. S. and B. C. Carlton (1985). "Conjugal plasmid transfer in Bacillus thuringiensis." *Basic Life Sci* **30**: 453-467.
- Chen, J., M. R. Brown, et al. (2005). "Comparison of the localization of Bacillus thuringiensis Cry1A delta-endotoxins and their binding proteins in larval midgut of tobacco hornworm, Manduca sexta." *Cell Tissue Res* **321**(1): 123-129.
- Clark, M., R. D. Cramer, et al. (1989). "Validation of the General-Purpose Tripos 5.2 Force-Field." *Journal of Computational Chemistry* **10**(8): 982-1012.
- Comeau SR, Gatchell DW, Vajda S, Camacho CJ. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*. 2004 Jan 1.
- Coux, F., V. Vachon, et al. (2001). "Role of interdomain salt bridges in the pore-forming ability of the Bacillus thuringiensis toxins Cry1Aa and Cry1Ac." *J Biol Chem* **276**(38): 35546-35551.
- Craveiro, K. I., J. E. Gomes Junior, et al. (2010). "Variant Cry1Ia toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer." *J Biotechnol* **145**(3): 215-221.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J, Bravo, A. and Dean, D.H. (2012). "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature."
- Dammak, M., S. Tounsi, et al. (2010). "Comparative study of Bacillus thuringiensis Cry1Ia and Cry1Aa delta-endotoxins: activation process and toxicity against Prays oleae." *J Invertebr Pathol* **104**(1): 39-43.
- DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L.: Particle Mesh Ewald – an N.log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, **1993**, *98*, 10089-10092.
- Dean, D.H. Rajamohan, F. Lee, M.K. Wu, S.-J. Chen, X.J. Alcantara, E. Hussain S.R. (1996), Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis—a minireview *Gene*, **179** pp. 111–117.
- de Barjac, H. and A. Bonnefoi (1968). "A classification of strains of Bacillus thuringiensis Berliner with a key to their differentiation." *J Invertebr Pathol* **11**(3): 335-347.
- de Groot, B. L.; Grubmuller, H.: Water Permeation Across Biological Membranes: Mechanism and Dynamics of Aquaporin-1 and GlpF. *Science*, **2001**, *294*, 2353-2357.
- de Maagd, R. A., A. Bravo, et al. (2001). "How Bacillus thuringiensis has evolved specific toxins to colonize the insect world." *Trends Genet* **17**(4): 193-199.
- de Maagd, R. A., A. Bravo, et al. (2003). "Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria." *Annu Rev Genet* **37**: 409-433.
- Delano, W. L.: The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific, Sao Carlos, CA, USA, 2002. <http://www.pymol.org>
- Denolf, P., K. Hendrickx, et al. (1997). "Cloning and characterization of Manduca sexta and Plutella xylostella midgut aminopeptidase N enzymes related to Bacillus thuringiensis toxin-binding proteins." *Eur J Biochem* **248**(3): 748-761.
- Derbyshire, D. J., D. J. Ellar, et al. (2001). "Crystallization of the Bacillus thuringiensis toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**(Pt 12): 1938-1944.
- Devine, G. J. and M. J. Furlong (2007). "Insecticide use: Contexts and ecological consequences." *Agriculture and Human Values* **24**(3): 281-306.
- Dunne, J., A. M. Hanby, et al. (1995). "Molecular-Cloning and Tissue Expression of Fat, the Human Homolog of the Drosophila Fat Gene That Is Located on Chromosome 4q34-Q35 and Encodes a Putative Adhesion Molecule." *Genomics* **30**(2): 207-223.
- Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, v.32, p.1792-1797, 2004.

- Fast, P. G. and T. A. Angus (1965). "Effects of Parasporal Inclusions of *Bacillus Thuringiensis* Var. Sotto Ishiwata on the Permeability of the Gut Wall of *Bombyx Mori* (Linnaeus) Larvae." J Invertebr Pathol **20**: 29-32.
- Fernandez, L. E., K. G. Aimanova, et al. (2006). "A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae." Biochemical Journal **394**: 77-84.
- Fernandez-Ballester, G. and L. Serrano (2006). "Prediction of protein-protein interaction based on structure." Methods Mol Biol **340**: 207-234.
- Fernandez-Luna, M. T., H. Lanz-Mendoza, et al. (2010). "An alpha-amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp. israelensis Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae)." Environ Microbiol **12**(3): 746-757.
- Flores, H. Soberón, X. Sánchez, J. Bravo, A. (1997). Isolated domain II and III from the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin binds to lepidopteran midgut membranes. FEBS Lett., **414**, pp. 313–318.
- Gahan, L. J., F. Gould, et al. (2001). "Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*." Science **293**(5531): 857-860.
- Galitsky, N., V. Cody, et al. (2001). "Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **57**(Pt 8): 1101-1109.
- Garczynski, S. F., J. W. Crim, et al. (1991). "Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by protein blot analysis." Appl Environ Microbiol **57**(10): 2816-2820.
- Gill, S. S., E. A. Cowles, et al. (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**(45): 27277-27282.
- Gingrich, R. E., N. Allan, et al. (1974). "*Bacillus thuringiensis*: laboratory tests against four species of biting lice (Mallophaga: Trichodectidae)." J Invertebr Pathol **23**(2): 232-236.
- Girade, F. Vachon, V. Lebel, G. Préfontaine, G. Scgwartz, J.-L. Masson, L. Laprade R. (2009). Chemical modification of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin single-cysteine mutants reveals the importance of domain I structural elements in the mechanism of pore formation. Biochim. Biophys. Acta., **1788** pp. 575–580
- Girard, F., V. Vachon, et al. (2008). "Cysteine scanning mutagenesis of alpha4, a putative pore-lining helix of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa." Appl Environ Microbiol **74**(9): 2565-2572.
- Girard, F., V. Vachon, et al. (2009). "Helix alpha 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin plays a critical role in the postbinding steps of pore formation." Appl Environ Microbiol **75**(2): 359-365.
- Gomez, I., D. H. Dean, et al. (2003). "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 **42**(35): 10482-10489.
- Gomez, I., I. Arenas, et al. (2006). "Specific epitopes of domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*." J Biol Chem **281**(45): 34032-34039.
- Gomez, I., J. Miranda-Rios, et al. (2002). "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." J Biol Chem **277**(33): 30137-30143.
- Gomez, I., J. Sanchez, et al. (2002). "Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin." FEBS Lett **513**(2-3): 242-246.
- Gonzalez-Reyes, A. (2003). "Stem cells, niches and cadherins: a view from *Drosophila*." J Cell Sci **116**(Pt 6): 949-954.
- Griffitts, J. S., D. L. Huffman, et al. (2003). "Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions." Journal of Biological Chemistry **278**(46): 45594-45602.
- Griffitts, J. S., S. M. Haslam, et al. (2005). "Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin." Science **307**(5711): 922-925.
- Grochulski, P., L. Masson, et al. (1995). "*Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation." J Mol Biol **254**(3): 447-464.
- Grossi-de-Sa, M. F., M. Quezado de Magalhaes, et al. (2007). "Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a cry1ia-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain." J Biochem Mol Biol **40**(5): 773-782.
- Guo, S., S. Ye, et al. (2009). "Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*." J Struct Biol **168**(2): 259-266.



- Haider, M. Z. and S. Mahmood (1990). "Bacillus thuringiensis insecticidal delta-endotoxin: diversity of crystal proteins and its relatedness to the toxicity spectrum." *J Basic Microbiol* **30**(4): 251-258.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M. & Hunter, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, **241**, 42–52 (1988)
- Hannay, C. L. and P. Fitz-James (1955). "The protein crystals of Bacillus thuringiensis Berliner." *Can J Microbiol* **1**(8): 694-710.
- Heimpel, A. M. (1967). "A critical review of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner and other crystalliferous bacteria." *Annu Rev Entomol* **12**: 287-322.
- Herman, R. A., P. N. Scherer, et al. (2002). "Binary insecticidal crystal protein from Bacillus thuringiensis, strain PS149B1: effects of individual protein components and mixtures in laboratory bioassays." *J Econ Entomol* **95**(3): 635-639.
- Herrero, S., T. Gechev, et al. (2005). "Bacillus thuringiensis Cry1Ca-resistant Spodoptera exigua lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes." *BMC Genomics* **6**: 96.
- Herrnstadt, C., T. E. Gilroy, et al. (1987). "Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a coleopteran-active delta-endotoxin gene from Bacillus thuringiensis subsp. san diego." *Gene* **57**(1): 37-46.
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H.J.C., Fraaije, J.G.E.M.; (1997). LINC: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. *J. Comp. Chem.* **18**; 1463–1472.
- Hofte, H. and H. R. Whiteley (1989). "Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis." *Microbiol Rev* **53**(2): 242-255.
- Hossain, D. M., Y. Shitomi, et al. (2004). "Characterization of a novel plasma membrane protein, expressed in the midgut epithelia of Bombyx mori, that binds to Cry1A toxins." *Applied and Environmental Microbiology* **70**(8): 4604-4612.
- Hua, G., R. Zhang, et al. (2008). "Anopheles gambiae cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of Bacillus thuringiensis israelensis and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity." *Biochemistry* **47**(18): 5101-5110.
- Hua, G., R. Zhang, et al. (2009). "Anopheles gambiae alkaline phosphatase is a functional receptor of Bacillus thuringiensis jegathesan Cry11Ba toxin." *Biochemistry* **48**(41): 9785-9793.
- Humphrey, W., A. Dalke, et al. (1996). "VMD: visual molecular dynamics." *J Mol Graph* **14**(1): 33-38, 27-38.
- James, C. (2010). "Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011." *ISAAA Brief N° 42*. Ithaca, NY: ISAAA.
- Jimenez-Juarez, N., C. Munoz-Garay, et al. (2007). "Bacillus thuringiensis Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to Manduca sexta larvae." *J Biol Chem* **282**(29): 21222-21229.
- Jimenez-Juarez, N., C. Munoz-Garay, et al. (2008). "The pre-pore from Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin is necessary to induce insect death in Manduca sexta." *Peptides* **29**(2): 318-323.
- Jin, X. S., M. A. Walker, et al. (2012). "Crystal structures of Drosophila N-cadherin ectodomain regions reveal a widely used class of Ca<sup>2+</sup>-free interdomain linkers." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(3): E127-E134.
- Jorgensen, W. L. and J. Tirado-Rives (1988). "The OPLS optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin." *J. Am. Chem. Soc.*, **110**: 1657-1666.
- Jurat-Fuentes, J. L. and M. J. Adang (2006). "The Heliothis virescens cadherin protein expressed in Drosophila S2 cells functions as a receptor for Bacillus thuringiensis Cry1A but not Cry1Fa toxins." *Biochemistry* **45**(32): 9688-9695.
- Jurat-Fuentes, J. L., L. J. Gahan, et al. (2004). "The HevCaLP protein mediates binding specificity of the Cry1A class of Bacillus thuringiensis toxins in Heliothis virescens." *Biochemistry* **43**(44): 14299-14305.
- Kanintronkul, Y., I. Sramala, et al. (2003). "Specific mutations within the alpha4-alpha5 loop of the Bacillus thuringiensis Cry4B toxin reveal a crucial role for Asn-166 and Tyr-170." *Mol Biotechnol* **24**(1): 11-20.
- Kashyap, S., B. D. Singh, et al. (2012). "Computational tridimensional protein modeling of Cry1Ab19 toxin from Bacillus thuringiensis BtX-2." *J Microbiol Biotechnol* **22**(6): 788-792.
- Kawar, Z. S., I. Van Die, et al. (2002). "Molecular cloning and enzymatic characterization of a UDP-GalNAc:GlcNAc(β)-R β1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase from Caenorhabditis elegans." *J Biol Chem* **277**(38): 34924-34932.
- Keeton, T. P. and L. A. Bulla, Jr. (1997). "Ligand specificity and affinity of BT-R1, the Bacillus thuringiensis Cry1A toxin receptor from Manduca sexta, expressed in mammalian and insect cell cultures." *Appl Environ Microbiol* **63**(9): 3419-3425.

- Kitson, D. H. and A. T. Hagler (1988). "Theoretical studies of the structure and molecular dynamics of a peptide crystal." Biochemistry **27**(14): 5246-5257.
- Knaak, N., A. R. Franz, et al. (2010). "Histopathology and the lethal effect of Cry proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith Caterpillars (Lepidoptera, Noctuidae)." Braz J Biol **70**(3): 677-684.
- Knight, P. J., N. Crickmore, et al. (1994). "The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N." Mol Microbiol **11**(3): 429-436.
- Knowles, B. H. and D. J. Ellar (1987). "Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with different insect specificity." Biochimica et Biophysica Acta **924**(3): 509-518.
- Krieger, I. V., L. P. Revina, et al. (1999). "Membrane proteins of *Aedes aegypti* larvae bind toxins Cry4B and Cry11A of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*." Biochemistry (Mosc) **64**(10): 1163-1168.
- Kumar, N. S. and G. Venkateswerlu (1998). "Analysis of 66 kDa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* reveals differential amino terminal processing of protoxin by endogenous protease(s)." Biochem Mol Biol Int **45**(4): 769-774.
- Kumar, S., A. Chandra, et al. (2008). "*Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: an environment friendly insect-pest management strategy." J Environ Biol **29**(5): 641-653.
- Lacey, L. A. (2007). "*Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control." J Am Mosq Control Assoc **23**(2 Suppl): 133-163.
- Larson, L. V. and C. M. Ignoffo (1971). "Activity of *Bacillus thuringiensis*, varieties *thuringiensis* and *galleriae*, against fall cankerworm." J Econ Entomol **64**(6): 1567-1568.
- Laskowski, R. A., M. W. MacArthur, et al. (1993). "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures." Journal of Applied Crystallography **26**(2): 283-291.
- Leach, A. R. (2001). "Molecular Modelling Principles and Applications." Longman, Cingapura **1nd Ed**.
- Lennard-Jones, J. E. (1931). "Cohesion." Proceedings of the Physical Society **43**(5): 461-482.
- Lereclus, D., M. M. Lecadet, et al. (1982). "Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystalliferous strains." Mol Gen Genet **186**(3): 391-398.
- Levitt, M. and R. Sharon (1988). "Accurate simulation of protein dynamics in solution." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(20): 7557-7561.
- Lewis, F. B., N. R. Dubois, et al. (1974). "Gypsy moth: efficacy of aerially-applied *Bacillus thuringiensis*." J Econ Entomol **67**(3): 351-354.
- Li, J. D., J. Carroll, et al. (1991). "Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution." Nature **353**(6347): 815-821.
- Liang, Y., S. S. Patel, et al. (1995). "Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity." J Biol Chem **270**(42): 24719-24724.
- Likitvivanavong, S., J. Chen, et al. (2011). "Cadherin, alkaline phosphatase, and aminopeptidase N as receptors of Cry11Ba toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* in *Aedes aegypti*." Appl Environ Microbiol **77**(1): 24-31.
- Likitvivanavong, S., J. W. Chen, et al. (2011). "Multiple Receptors as Targets of Cry Toxins in Mosquitoes." Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**(7): 2829-2838.
- Likitvivanavong, S., K. G. Aimanova, et al. (2009). "Loop residues of the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin are important for mosquitocidal activity." FEBS Lett **583**(12): 2021-2030.
- Liu, Y. L., Q. Y. Wang, et al. (2010). "Residue 544 in domain III of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin is involved in protein structure stability." Protein J **29**(6): 440-444.
- Lu, Y. J. and M. J. Adang (1996). "Conversion of *Bacillus thuringiensis* CryIAc-binding aminopeptidase to a soluble form by endogenous phosphatidylinositol phospholipase C." Insect Biochem Mol Biol **26**(1): 33-40.
- MacKerell, A. D., D. Bashford, et al. (1998). "All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins." Journal of Physical Chemistry B **102**(18): 3586-3616.
- Marroquin, L. D., D. Elyassnia, et al. (2000). "*Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*." Genetics **155**(4): 1693-1699.

- Martins, E. S., R. G. Monnerat, et al. (2010). "Midgut GPI-anchored proteins with alkaline phosphatase activity from the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) are putative receptors for the Cry1B protein of *Bacillus thuringiensis*." *Insect Biochem Mol Biol* **40**(2): 138-145.
- Masson L, Lu YJ, et al. (1995). "The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities." *Journal of Biological Chemistry* **270**(35): 20309-20315.
- McCammon, J. A., B. R. Gelin, et al. (1977). "Dynamics of folded proteins." *Nature* **267**(5612): 585-590.
- McNall, R. J. and M. J. Adang (2003). "Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **33**(10): 999-1010.
- Morse, R. J., T. Yamamoto, et al. (2001). "Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope." *Structure* **9**(5): 409-417.
- Nagamatsu, Y., T. Koike, et al. (1999). "The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin." *FEBS Lett* **460**(2): 385-390.
- Nakanishi, K., K. Yaoi, et al. (2002). "Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella* -- their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin." *FEBS Lett* **519**(1-3): 215-220.
- Nakasu, E. Y., A. A. Firmino, et al. (2010). "Analysis of Cry8Ka5-binding proteins from *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) midgut." *J Invertebr Pathol* **104**(3): 227-230.
- Navon, A., M. Klein, et al. (1990). "*Bacillus thuringiensis* potency bioassays against *Heliothis armigera*, *Earias insulana*, and *Spodoptera littoralis* larvae based on standardized diets." *J Invertebr Pathol* **55**(3): 387-393.
- Nunez-Valdez, M., J. Sanchez, et al. (2001). "Structural and functional studies of alpha-helix 5 region from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin." *Biochim Biophys Acta* **1546**(1): 122-131.
- Ochoa-Campuzano, C., M. D. Real, et al. (2007). "An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor." *Biochem Biophys Res Commun* **362**(2): 437-442.
- Oliveira, G. R., M. C. Silva, et al. (2011). "Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*)." *BMC Biotechnol* **11**: 85.
- Pacheco, S., I. Gomez, et al. (2009). "Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a "ping pong" binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors." *Journal of Biological Chemistry* **284**(47): 32750-32757.
- Pardo-Lopez, L., C. Munoz-Garay, et al. (2009). "Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*." *Peptides* **30**(3): 589-595.
- Pardo-Lopez, L., I. Gomez, et al. (2006). "Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion." *Biochemistry* **45**(34): 10329-10336.
- Pardo-Lopez, L., M. Soberon, et al. (2012). "*Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection." *FEMS Microbiol Rev.*
- Park, Y., M. A. Abdullah, et al. (2009). "Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa and Cry3Bb toxicities to coleopteran larvae by a toxin-binding fragment of an insect cadherin." *Appl Environ Microbiol* **75**(10): 3086-3092.
- Pettitt, J. (2005). "The cadherin superfamily." *Wormbook* **29**: 1-9.
- Pigott, C. R. and D. J. Ellar (2007). "Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity." *Microbiol Mol Biol Rev* **71**(2): 255-281.
- Rajagopal, R., N. Agrawal, et al. (2003). "Recombinantly expressed isoenzymic aminopeptidases from *Helicoverpa armigera* (American cotton bollworm) midgut display differential interaction with closely related *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins." *Biochem J* **370**(Pt 3): 971-978.
- Rajamohan, F., S. R. Hussain, et al. (1996). "Mutations at domain II, loop 3, of *Bacillus thuringiensis* CryIAa and CryIAb delta-endotoxins suggest loop 3 is involved in initial binding to lepidopteran midguts." *J Biol Chem* **271**(41): 25220-25226.
- Rausell, C., L. Pardo-Lopez, et al. (2004). "Unfolding Events in the Water-soluble Monomeric Cry1Ab Toxin during Transition to Oligomeric Pre-pore and Membrane-inserted Pore Channel." *Journal of Biological Chemistry* **279**(53): 55168-55175.
- Raymond, B., P. R. Johnston, et al. (2010). "*Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen?" *Trends Microbiol* **18**(5): 189-194.
- Rodriguez-Almazan, C., L. E. Zavala, et al. (2009). "Dominant negative mutants of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin function as anti-toxins: demonstration of the role of oligomerization in toxicity." *PLoS One* **4**(5): 5545.

- Rogoff, M. H. and A. A. Yousten (1969). "Bacillus thuringiensis: microbiological considerations." Annu Rev Microbiol **23**: 357-386.
- Rohl, C. A., Strauss, C. E., Misura, K. M. and Baker, D. (2004). Protein structure prediction using Rosetta. Methods Enzymol. **383**:66-93.
- Sali, A., L. Potterton, et al. (1995). "Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER." Proteins **23**(3): 318-326.
- Samish, I. (2009). "Search and Sampling in Structural Bioinformatics." Structural Bioinformatics, 2nd., 2009. Wiley-Blackwell, Estados Unidos da América: 207-236.
- Samish, I., J. Gu, et al. (2009). "Protein Motion: Simulation." Structural Bioinformatics, 2<sup>nd</sup>., 2009. Wiley-Blackwell, Estados Unidos da América.: 907-936.
- Sangadala, S., F. S. Walters, et al. (1994). "A mixture of Manduca sexta aminopeptidase and phosphatase enhances Bacillus thuringiensis insecticidal CryIA(c) toxin binding and 86Rb(+)-K<sup>+</sup> efflux in vitro." J Biol Chem **269**(13): 10088-10092.
- Schlick, T. (2006). "Molecular Modeling and Simulation: an Interdisciplinary Guide." New York: Springer **1.ed.**
- Schnepf, E., N. Crickmore, et al. (1998). "Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins." Microbiol Mol Biol Rev **62**(3): 775-806.
- Schnepf, H. E., H. C. Wong, et al. (1987). "Expression of a cloned Bacillus thuringiensis crystal protein gene in Escherichia coli." J Bacteriol **169**(9): 4110-4118.
- Schwartz, J. L., M. Juteau, et al. (1997). "Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of Bacillus thuringiensis through disulfide bond engineering." FEBS Lett **410**(2-3): 397-402.
- Smedley, D. P. and D. J. Ellar (1996). "Mutagenesis of three surface-exposed loops of a Bacillus thuringiensis insecticidal toxin reveals residues important for toxicity, receptor recognition and possibly membrane insertion." Microbiology **142 ( Pt 7)**: 1617-1624.
- Soberon, M., L. E. Fernandez, et al. (2007). "Mode of action of mosquitocidal Bacillus thuringiensis toxins." Toxicon **49**(5): 597-600.
- Soberon, M., L. Pardo-Lopez, et al. (2007). "Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance." Science **318**(5856): 1640-1642.
- Soberon, M., S. S. Gill, et al. (2009). "Signaling versus punching hole: How do Bacillus thuringiensis toxins kill insect midgut cells?" Cell Mol Life Sci **66**(8): 1337-1349.
- Stemmer, W.,P.,C. 1994. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. Nature.370: 389-91
- Stephens E, S. J., Maslen SL, Williams DH, Packman LC, Ellar DJ (2004). "The N-linked oligosaccharides of aminopeptidase N from Manduca sexta: site localization and identification of novel N-glycan structures." European Journal Biochemistry **271**(21): 4241-4258.
- Takesue, S., K. Yokota, et al. (1992). "Partial release of aminopeptidase N from larval midgut cell membranes of the silkworm, Bombyx mori, by phosphatidylinositol-specific phospholipase C." Comp Biochem Physiol B **102**(1): 7-11.
- Terra, W. R. and C. Ferreira (1994). "Insect Digestive Enzymes - Properties, Compartmentalization and Function." Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology **109**(1): 1-62.
- Thomas, D. J., J. A. Morgan, et al. (2001). "Plasmid transfer between Bacillus thuringiensis subsp. israelensis strains in laboratory culture, river water, and dipteran larvae." Appl Environ Microbiol **67**(1): 330-338.
- Tian, Y. C., X. F. Qin, et al. (1991). "Insect resistance of transgenic tobacco plants expressing delta-endotoxin gene of Bacillus thuringiensis." Chin J Biotechnol **7**(1): 1-13.
- Tsuda, Y., F. Nakatani, et al. (2003). "Cytotoxic activity of Bacillus thuringiensis Cry proteins on mammalian cells transfected with cadherin-like Cry receptor gene of Bombyx mori (silkworm)." Biochem J **369**(Pt 3): 697-703.
- Vachon, V., G. Prefontaine, et al. (2002). "Role of helix 3 in pore formation by the Bacillus thuringiensis insecticidal toxin Cry1Aa." Biochemistry **41**(19): 6178-6184.
- Vachon, V., G. Prefontaine, et al. (2004). "Helix 4 mutants of the Bacillus thuringiensis insecticidal toxin Cry1Aa display altered pore-forming abilities." Appl Environ Microbiol **70**(10): 6123-6130.
- Vachon, V., R. Laprade, et al. (2012). "Current models of the mode of action of Bacillus thuringiensis insecticidal crystal proteins: A critical review." J Invertebr Pathol.
- Vadlamudi, R. K., E. Weber, et al. (1995). "Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of Bacillus thuringiensis." J Biol Chem **270**(10): 5490-5494.
- Vadlamudi, R. K., T. H. Ji, et al. (1993). "A specific binding protein from Manduca sexta for the insecticidal toxin of Bacillus thuringiensis subsp. berliner." J Biol Chem **268**(17): 12334-12340.

- Valaitis, A. P., A. Mazza, et al. (1997). "Interaction analyses of Bacillus thuringiensis Cry1A toxins with two aminopeptidases from gypsy moth midgut brush border membranes." Insect Biochem Mol Biol **27**(6): 529-539.
- Valaitis, A. P., J. L. Jenkins, et al. (2001). "Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds Bacillus thuringiensis Cry1A toxins with high affinity." Arch Insect Biochem Physiol **46**(4): 186-200.
- van Frankenhuyzen, K. (2009). "Insecticidal activity of Bacillus thuringiensis crystal proteins." J Invertebr Pathol **101**(1): 1-16.
- Van Gunsteren, W. F. B., S. R.; Eising, A. A.; Huenenberger, P. H.; Krueger, P.; Mark, A. E.; Scott, W. R. P.; Tironi, I. G.: . (1996). "Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide." Vdf Hochschulverlag AG, Zurich, Suica.
- Van Rie, J. (2000). "Bacillus thuringiensis and its use in transgenic insect control technologies." Int J Med Microbiol **290**(4-5): 463-469.
- Van Rie, J., S. Jansens, et al. (1989). "Specificity of Bacillus thuringiensis delta-endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects." Eur J Biochem **186**(1-2): 239-247.
- Van Rie, J., S. Jansens, et al. (1990). "Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of Bacillus thuringiensis delta-endotoxins." Appl Environ Microbiol **56**(5): 1378-1385.
- Vilas-Boas, L. A., G. F. Vilas-Boas, et al. (2000). "Survival and conjugation of Bacillus thuringiensis in a soil microcosm." FEMS Microbiol Ecol **31**(3): 255-259.
- Wako, H., M. Kato, et al. (2004). "ProMode: a database of normal mode analysis on protein molecules with a full-atom model. ." Bioinformatics **20**(13): 2035-2043.
- Wei, J. Z., K. Hale, et al. (2003). "Bacillus thuringiensis crystal proteins that target nematodes." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2760-2765.
- Willats WGT. 2002. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Molecular Biology*.50: 837-54.
- Wodak, S. J. and J. Janin (1978). "Computer Analysis of Protein-protein Interaction." Journal of Molecular Biology **124**: 323-342.
- Wolfersberger, M. G. (1990). "The toxicity of two Bacillus thuringiensis delta-endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins." Experientia **46**(5): 475-477.
- Xiang, W. F., X. L. Qiu, et al. (2009). "N546 in beta18-beta19 loop is important for binding and toxicity of the Bacillus thuringiensis Cry1Ac toxin." J Invertebr Pathol **101**(2): 119-123.
- Xie, R., M. Zhuang, et al. (2005). "Single amino acid mutations in the cadherin receptor from Heliothis virescens affect its toxin binding ability to Cry1A toxins." J Biol Chem **280**(9): 8416-8425.
- Xin-Min, Z., X. Li-Qiu, et al. (2009). "The theoretical three-dimensional structure of Bacillus thuringiensis Cry5Aa and its biological implications." Protein J **28**(2): 104-110.
- Yamvrias, C. and T. A. Angus (1969). "Toxicity of Bacillus thuringiensis for larvae of the clothes moth, Tineola bisselliella." J Invertebr Pathol **14**(3): 423-424.
- Yaoi, K., K. Nakanishi, et al. (1999). "cDNA cloning and expression of Bacillus thuringiensis Cry1Aa toxin binding 120 kDa aminopeptidase N from Bombyx mori." Biochim Biophys Acta **1444**(1): 131-137.
- Yaoi, K., T. Kadotani, et al. (1997). "Aminopeptidase N from Bombyx mori as a candidate for the receptor of Bacillus thuringiensis Cry1Aa toxin." Eur J Biochem **246**(3): 652-657.
- Zavala, L. E., L. Pardo-Lopez, et al. (2011). "Domains II and III of Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin remain exposed to the solvent after insertion of part of domain I into the membrane." J Biol Chem **286**(21): 19109-19117.
- Zhang, X., M. Candas, et al. (2005). "Cytotoxicity of Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells." Cell Death Differ **12**(11): 1407-1416.
- Zhang, X., M. Candas, et al. (2006). "A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of Bacillus thuringiensis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(26): 9897-9902.
- Zuniga-Navarrete, F., I. Gomez, et al. (2012). "A Tenebrio molitor GPI-anchored alkaline phosphatase is involved in binding of Bacillus thuringiensis Cry3Aa to brush border membrane vesicles." Peptides.

## 10. Anexo I

## Molecular Docking Cry1Aa/CAD-Ms

## Hydrogen bonds

no. name.name no. Chain no. name.name no. Chain  
Dist

1. 1341 O ALA 367 CAD / 7545 OG SER 409 Cry 2.93  
2. 1350 N ALA 369 CAD / 7540 O PHE 408 Cry 2.90  
3. 1355 O ALA 369 CAD / 7524 N PHE 408 Cry 3.26  
4. 1412 O SER 374 CAD / 7503 NH1 ARG 405 Cry 3.02  
5. 1412 O SER 374 CAD / 7506 NH2 ARG 405 Cry 3.14  
6. 1439 OE1 GLU 378 CAD / 6040 NH2 ARG 260 Cry 3.17  
7. 1453 N SER 380 CAD / 6027 O ILE 259 Cry 3.18  
8. 1460 O SER 380 CAD / 6011 N SER 258 Cry 2.79  
9. 1859 NH1 ARG 420 CAD / 8026 O LYS 458 Cry 2.85  
10. 2284 NH1 ARG 465 CAD / 7518 O SER 406 Cry 3.17  
11. 2287 NH2 ARG 465 CAD / 7518 O SER 406 Cry 2.81  
12. 2739 OH TYR 511 CAD / 6823 NH1 ARG 337 Cry 2.87  
13. 2760 O THR 513 CAD / 6906 ND2 ASN 345 Cry 2.75  
14. 2770 N VAL 515 CAD / 6888 O ILE 343 Cry 3.05  
15. 2777 O VAL 515 CAD / 6895 ND2 ASN 344 Cry 2.79

## Non-bonded contacts

<----- A T O M 1 -----> <----- A T O M 2 ----->  
no. name.name no. Chain no. name.name no. Chain  
Dist

1. 1329 ND1 HIS 366 CAD / 5981 O GLN 253 Cry 3.26  
2. 1332 CE1 HIS 366 CAD / 5981 O GLN 253 Cry 3.17  
3. 1340 C ALA 367 CAD / 7548 O SER 409 Cry 3.84  
4. 1340 C ALA 367 CAD / 7545 OG SER 409 Cry 3.71  
5. 1341 O ALA 367 CAD / 7543 CA SER 409 Cry 3.63  
6. 1341 O ALA 367 CAD / 7548 O SER 409 Cry 3.89  
7. 1341 O ALA 367 CAD / 7544 CB SER 409 Cry 3.60  
8. 1341 O ALA 367 CAD / 7545 OG SER 409 Cry 2.93  
9. 1342 N VAL 368 CAD / 7548 O SER 409 Cry 3.84  
10. 1344 CA VAL 368 CAD / 7548 O SER 409 Cry 3.60  
11. 1348 C VAL 368 CAD / 7548 O SER 409 Cry 3.29  
12. 1349 O VAL 368 CAD / 7548 O SER 409 Cry 3.72  
13. 1346 CG1 VAL 368 CAD / 5981 O GLN 253 Cry 3.54  
14. 1350 N ALA 369 CAD / 7540 O PHE 408 Cry 2.90  
15. 1350 N ALA 369 CAD / 7548 O SER 409 Cry 3.26  
16. 1352 CA ALA 369 CAD / 7540 O PHE 408 Cry 3.37  
17. 1354 C ALA 369 CAD / 7540 O PHE 408 Cry 3.15  
18. 1355 O ALA 369 CAD / 7521 CA GLY 407 Cry 3.71  
19. 1355 O ALA 369 CAD / 7522 C GLY 407 Cry 3.83  
20. 1355 O ALA 369 CAD / 7524 N PHE 408 Cry 3.26  
21. 1355 O ALA 369 CAD / 7539 C PHE 408 Cry 3.84  
22. 1355 O ALA 369 CAD / 7540 O PHE 408 Cry 2.85  
23. 1355 O ALA 369 CAD / 7580 CG1 VAL 413 Cry 2.91  
24. 1353 CB ALA 369 CAD / 7540 O PHE 408 Cry 3.86  
25. 1356 N PHE 370 CAD / 7540 O PHE 408 Cry 3.81  
26. 1358 CA PHE 370 CAD / 7521 CA GLY 407 Cry 3.57  
27. 1372 O PHE 370 CAD / 7510 O ARG 405 Cry 3.24  
28. 1372 O PHE 370 CAD / 7518 O SER 406 Cry 3.16  
29. 1359 CB PHE 370 CAD / 7490 CZ PHE 404 Cry 3.52  
30. 1360 CG PHE 370 CAD / 7521 CA GLY 407 Cry 3.75  
31. 1360 CG PHE 370 CAD / 7524 N PHE 408 Cry 3.39  
32. 1360 CG PHE 370 CAD / 7540 O PHE 408 Cry 3.79  
33. 1361 CD1 PHE 370 CAD / 7486 CE1 PHE 404 Cry 3.77  
34. 1361 CD1 PHE 370 CAD / 7490 CZ PHE 404 Cry 3.55  
35. 1361 CD1 PHE 370 CAD / 7521 CA GLY 407 Cry 3.47  
36. 1361 CD1 PHE 370 CAD / 7522 C GLY 407 Cry 3.59  
37. 1361 CD1 PHE 370 CAD / 7524 N PHE 408 Cry 3.25  
38. 1363 CD2 PHE 370 CAD / 7524 N PHE 408 Cry 3.85  
39. 1363 CD2 PHE 370 CAD / 7539 C PHE 408 Cry 3.68  
40. 1363 CD2 PHE 370 CAD / 7540 O PHE 408 Cry 3.32  
41. 1365 CE1 PHE 370 CAD / 5955 O GLY 250 Cry 3.73  
42. 1365 CE1 PHE 370 CAD / 5958 CA SER 251 Cry 3.69  
43. 1365 CE1 PHE 370 CAD / 5963 O SER 251 Cry 3.30  
44. 1365 CE1 PHE 370 CAD / 7524 N PHE 408 Cry 3.52  
45. 1365 CE1 PHE 370 CAD / 7526 CA PHE 408 Cry 3.75  
46. 1367 CE2 PHE 370 CAD / 5955 O GLY 250 Cry 3.71  
47. 1367 CE2 PHE 370 CAD / 7539 C PHE 408 Cry 3.50  
48. 1367 CE2 PHE 370 CAD / 7540 O PHE 408 Cry 3.55  
49. 1367 CE2 PHE 370 CAD / 7541 N SER 409 Cry 3.74  
50. 1369 CZ PHE 370 CAD / 5954 C GLY 250 Cry 3.80  
51. 1369 CZ PHE 370 CAD / 5955 O GLY 250 Cry 2.97  
52. 1369 CZ PHE 370 CAD / 5958 CA SER 251 Cry 3.53  
53. 1369 CZ PHE 370 CAD / 5962 C SER 251 Cry 3.84  
54. 1369 CZ PHE 370 CAD / 5963 O SER 251 Cry 3.30  
55. 1369 CZ PHE 370 CAD / 7526 CA PHE 408 Cry 3.77  
56. 1369 CZ PHE 370 CAD / 7539 C PHE 408 Cry 3.70  
57. 1385 CB GLU 372 CAD / 7502 CZ ARG 405 Cry 3.43  
58. 1385 CB GLU 372 CAD / 7503 NH1 ARG 405 Cry 3.38  
59. 1386 CG GLU 372 CAD / 7502 CZ ARG 405 Cry 3.79  
60. 1386 CG GLU 372 CAD / 7503 NH1 ARG 405 Cry 3.19  
61. 1412 O SER 374 CAD / 7502 CZ ARG 405 Cry 3.54  
62. 1412 O SER 374 CAD / 7503 NH1 ARG 405 Cry 3.02  
63. 1412 O SER 374 CAD / 7506 NH2 ARG 405 Cry 3.14  
64. 1442 O GLU 378 CAD / 6031 CB ARG 260 Cry 3.54  
65. 1442 O GLU 378 CAD / 6032 CG ARG 260 Cry 3.46  
66. 1439 OE1 GLU 378 CAD / 6036 CZ ARG 260 Cry 3.87  
67. 1439 OE1 GLU 378 CAD / 6040 NH2 ARG 260 Cry 3.17  
68. 1445 CA GLU 379 CAD / 6032 CG ARG 260 Cry 3.70  
69. 1447 CG GLU 379 CAD / 6034 NE ARG 260 Cry 3.40  
70. 1447 CG GLU 379 CAD / 6040 NH2 ARG 260 Cry 3.87  
71. 1449 OE1 GLU 379 CAD / 7506 NH2 ARG 405 Cry 3.75  
72. 1450 OE2 GLU 379 CAD / 6013 CA SER 258 Cry 3.72  
73. 1450 OE2 GLU 379 CAD / 6018 O SER 258 Cry 3.68  
74. 1453 N SER 380 CAD / 6027 O ILE 259 Cry 3.18  
75. 1455 CA SER 380 CAD / 6027 O ILE 259 Cry 3.53  
76. 1459 C SER 380 CAD / 6011 N SER 258 Cry 3.82  
77. 1459 C SER 380 CAD / 6027 O ILE 259 Cry 3.86  
78. 1460 O SER 380 CAD / 6005 O GLU 256 Cry 3.31  
79. 1460 O SER 380 CAD / 6008 CA GLY 257 Cry 3.59  
80. 1460 O SER 380 CAD / 6009 C GLY 257 Cry 3.64  
81. 1460 O SER 380 CAD / 6011 N SER 258 Cry 2.79  
82. 1460 O SER 380 CAD / 6013 CA SER 258 Cry 3.67  
83. 1460 O SER 380 CAD / 6017 C SER 258 Cry 3.48  
84. 1460 O SER 380 CAD / 6019 N ILE 259 Cry 3.41  
85. 1460 O SER 380 CAD / 6027 O ILE 259 Cry 3.35  
86. 1456 CB SER 380 CAD / 6027 O ILE 259 Cry 3.08  
87. 1463 CA HIS 381 CAD / 6008 CA GLY 257 Cry 3.38  
88. 1472 O HIS 381 CAD / 6005 O GLU 256 Cry 3.84  
89. 1465 CG HIS 381 CAD / 6008 CA GLY 257 Cry 3.80  
90. 1475 CA GLN 382 CAD / 5999 CB GLU 256 Cry 3.58  
91. 1476 CB GLN 382 CAD / 5982 N GLY 254 Cry 3.78  
92. 1476 CB GLN 382 CAD / 5999 CB GLU 256 Cry 3.76  
93. 1476 CB GLN 382 CAD / 6002 OE1 GLU 256 Cry 3.80  
94. 1477 CG GLN 382 CAD / 5982 N GLY 254 Cry 3.57  
95. 1477 CG GLN 382 CAD / 5984 CA GLY 254 Cry 3.76  
96. 1478 CD GLN 382 CAD / 5984 CA GLY 254 Cry 3.70  
97. 1479 OE1 GLN 382 CAD / 5982 N GLY 254 Cry 3.87  
98. 1479 OE1 GLN 382 CAD / 5984 CA GLY 254 Cry 3.09  
99. 1479 OE1 GLN 382 CAD / 5985 C GLY 254 Cry 3.57  
100. 1479 OE1 GLN 382 CAD / 5986 O GLY 254 Cry 3.39  
101. 1479 OE1 GLN 382 CAD / 6006 N GLY 257 Cry 3.85  
102. 1479 OE1 GLN 382 CAD / 6008 CA GLY 257 Cry 3.80  
103. 1485 N LEU 383 CAD / 6002 OE1 GLU 256 Cry 3.76  
104. 1490 CD1 LEU 383 CAD / 5429 NH2 ARG 201 Cry 3.43  
105. 1996 NH2 ARG 431 CAD / 7564 OG SER 411 Cry 3.26  
106. 2264 CG2 THR 463 CAD / 7564 OG SER 411 Cry 3.54  
107. 2283 CZ ARG 465 CAD / 7518 O SER 406 Cry 3.44  
108. 2284 NH1 ARG 465 CAD / 7518 O SER 406 Cry 3.17  
109. 2287 NH2 ARG 465 CAD / 7518 O SER 406 Cry 2.81  
110. 2728 CB TYR 511 CAD / 6906 ND2 ASN 345 Cry 3.85  
111. 2729 CG TYR 511 CAD / 6906 ND2 ASN 345 Cry 3.27  
112. 2730 CD1 TYR 511 CAD / 6905 OD1 ASN 345 Cry 3.43  
113. 2730 CD1 TYR 511 CAD / 6906 ND2 ASN 345 Cry 3.56  
114. 2732 CD2 TYR 511 CAD / 6906 ND2 ASN 345 Cry 3.02  
115. 2734 CE1 TYR 511 CAD / 6904 CG ASN 345 Cry 3.85  
116. 2734 CE1 TYR 511 CAD / 6905 OD1 ASN 345 Cry 3.42  
117. 2734 CE1 TYR 511 CAD / 6906 ND2 ASN 345 Cry 3.73  
118. 2736 CE2 TYR 511 CAD / 6906 ND2 ASN 345 Cry 3.24  
119. 2738 CZ TYR 511 CAD / 6906 ND2 ASN 345 Cry 3.60  
120. 2739 OH TYR 511 CAD / 6822 CZ ARG 337 Cry 3.59

121. 2739 OH TYR 511 CAD /6823 NH1 ARG 337 Cry 2.87  
122. 2739 OH TYR 511 CAD /6826 NH2 ARG 337 Cry 3.36  
123. 2754 CA THR 513 CAD /6871 CG2 ILE 341 Cry 3.72  
124. 2759 C THR 513 CAD / 6871 CG2 ILE 341 Cry 3.80  
125. 2759 C THR 513 CAD / 6877 CA GLY 342 Cry 3.90  
126. 2759 C THR 513 CAD / 6906 ND2 ASN 345 Cry 3.54  
127. 2760 O THR 513 CAD / 6871 CG2 ILE 341 Cry 3.24  
128. 2760 O THR 513 CAD / 6875 N GLY 342 Cry 3.67  
129. 2760 O THR 513 CAD / 6877 CA GLY 342 Cry 3.66  
130. 2760 O THR 513 CAD / 6904 CG ASN 345 Cry 3.77  
131. 2760 O THR 513 CAD / 6906 ND2 ASN 345 Cry 2.75  
132. 2755 CB THR 513 CAD / 6874 O ILE 341 Cry 3.89  
133. 2756 OG1 THR 513 CAD /7571 CB SER 412 Cry 3.87  
134. 2761 N MET 514 CAD / 6906 ND2 ASN 345 Cry 3.78  
135. 2763 CA MET 514 CAD / 6888 O ILE 343 Cry 3.46  
136. 2763 CA MET 514 CAD /6906 ND2 ASN 345 Cry 3.45  
137. 2768 C MET 514 CAD / 6888 O ILE 343 Cry 3.77  
138. 2768 C MET 514 CAD / 6906 ND2 ASN 345 Cry 3.41  
139. 2764 CB MET 514 CAD / 6878 C GLY 342 Cry 3.88  
140. 2764 CB MET 514 CAD / 6880 N ILE 343 Cry 3.52  
141. 2764 CB MET 514 CAD / 6888 O ILE 343 Cry 3.51  
142. 2764 CB MET 514 CAD 6884 CG1 ILE 343 Cry 3.81  
143. 2766 SD MET 514 CAD / 7570 CA SER 412 Cry 3.65  
144. 2766 SD MET 514 CAD / 7575 O SER 412 Cry 3.70  
145. 2770 N VAL 515 CAD / 6888 O ILE 343 Cry 3.05  
146. 2770 N VAL 515 CAD / 6904 CG ASN 345 Cry 3.90  
147. 2770 N VAL 515 CAD / 6906 ND2 ASN 345 Cry 3.36  
148. 2777 O VAL 515 CAD / 6888 O ILE 343 Cry 3.33  
149. 2777 O VAL 515 CAD / 6892 CB ASN 344 Cry 3.15  
150. 2777 O VAL 515 CAD / 6893 CG ASN 344 Cry 3.43  
151. 2777 O VAL 515 CAD / 6895 ND2 ASN 344 Cry 2.79  
152. 2773 CB VAL 515 CAD /6906 ND2 ASN 345 Cry 3.87  
153. 2774 CG1 VAL 515 CAD /6904 CG ASN 345 Cry 3.77  
154. 2774 CG1 VAL 515 CAD/6905 OD1 ASN 345 Cry 3.52  
155. 2784 C VAL 516 CAD / 6895 ND2 ASN 344 Cry 3.53  
156. 2785 O VAL 516 CAD / 6892 CB ASN 344 Cry 3.76  
157. 2785 O VAL 516 CAD / 6893 CG ASN 344 Cry 3.48  
158. 2785 O VAL 516 CAD / 6895 ND2 ASN 344 Cry 3.29  
159. 2786 N ASP 517 CAD / 6895 ND2 ASN 344 Cry 3.54  
160. 2788 CA ASP 517 CAD /6895 ND2 ASN 344 Cry 3.77  
161. 3207 C ALA 561 CAD / 7567 O SER 411 Cry 3.55  
162. 3209 N GLY 562 CAD / 7567 O SER 411 Cry 3.41  
163. 3211 CA GLY 562 CAD / 7567 O SER 411 Cry 3.52  
164. 3211 CA GLY 562 CAD /7581 CG2 VAL 413 Cry 3.68  
165. 3212 C GLY 562 CAD / 6884 CG1 ILE 343 Cry 3.50  
166. 3213 O GLY 562 CAD / 6883 CB ILE 343 Cry 3.79  
167. 3213 O GLY 562 CAD / 6884 CG1 ILE 343 Cry 3.20  
168. 3213 O GLY 562 CAD / 6885 CG2 ILE 343 Cry 3.61  
169. 3213 O GLY 562 CAD / 7581 CG2 VAL 413 Cry 3.75

Number of hydrogen bonds: 15

Number of non-bonded contacts: 169

## 11. Anexo II

## Molecular Docking Cry1Ac/CAD-Ha

## Hydrogen bonds

&lt;-- A T O M    1 --&gt;              &lt;-- A T O M    2 --&gt;

no.	nam	nam	no Chain/	no	nam	nam	no Chain/	no	Chain/Dist
1.	1171	OH	TYR	371 A /	5578	N	GLN	827 B	3.29
2.	1225	OE2	GLU	377 A /	5623	NH1	ARG	831 B	2.95
3.	2080	O	ARG	470 A /	7102	ND2	ASN	984 B	2.99
4.	2559	OE1	GLU	520 A /	6455	N	ILE	917 B	3.14

## Non-bonded contacts

&lt;-- A T O M    1 --&gt;              &lt;-- A T O M    2 --&gt;

Atom			Atom	Res	Res	Atom			Atom	Res	Res
no.	name	name	no.	Chain	no.	name	name	no.	Chain/Dist		
1.	1169	CE2	TYR	371 A /	5582	CB	GLN	827 B	3.37		
2.	1171	OH	TYR	371 A /	5560	CA	GLY	824 B	3.87		
3.	1171	OH	TYR	371 A /	5561	C	GLY	824 B	3.49		
4.	1171	OH	TYR	371 A /	5562	O	GLY	824 B	3.30		
5.	1171	OH	TYR	371 A /	5566	C	SER	825 B	3.76		
6.	1171	OH	TYR	371 A /	5572	N	ALA	826 B	3.58		
7.	1171	OH	TYR	371 A /	5578	N	GLN	827 B	3.29		
8.	1171	OH	TYR	371 A /	5582	CB	GLN	827 B	3.67		
9.	1177	O	THR	372 A /	5562	O	GLY	824 B	3.84		
10.	1188	CG1	VAL	373 A /	5580	C	GLN	827 B	3.77		
11.	1188	CG1	VAL	373 A /	5582	CB	GLN	827 B	3.47		
12.	1188	CG1	VAL	373 A /	5590	N	GLY	828 B	3.41		
13.	1195	CB	ALA	374 A /	7083	CD2	PHE	982 B	3.44		
14.	1199	C	PHE	375 A /	7092	CB	SER	983 B	3.89		
15.	1200	O	PHE	375 A /	5620	CD	ARG	831 B	3.75		
16.	1200	O	PHE	375 A /	7093	OG	SER	983 B	3.84		
17.	1201	CB	PHE	375 A /	5591	CA	GLY	828 B	3.79		
18.	1202	CG	PHE	375 A /	5591	CA	GLY	828 B	3.35		
19.	1202	CG	PHE	375 A /	5592	C	GLY	828 B	3.55		
20.	1202	CG	PHE	375 A /	5593	O	GLY	828 B	3.40		
21.	1203	CD1	PHE	375 A /	5567	O	SER	825 B	3.88		
22.	1203	CD1	PHE	375 A /	5591	CA	GLY	828 B	3.39		
23.	1203	CD1	PHE	375 A /	5592	C	GLY	828 B	3.84		
24.	1204	CD2	PHE	375 A /	5591	CA	GLY	828 B	3.76		
25.	1204	CD2	PHE	375 A /	5592	C	GLY	828 B	3.36		
26.	1204	CD2	PHE	375 A /	5593	O	GLY	828 B	2.92		
27.	1204	CD2	PHE	375 A /	7078	C	PHE	982 B	3.54		
28.	1204	CD2	PHE	375 A /	7079	O	PHE	982 B	3.08		
29.	1205	CE1	PHE	375 A /	5562	O	GLY	824 B	3.48		
30.	1205	CE1	PHE	375 A /	5565	CA	SER	825 B	3.35		
31.	1205	CE1	PHE	375 A /	5566	C	SER	825 B	3.51		
32.	1205	CE1	PHE	375 A /	5567	O	SER	825 B	2.96		
33.	1205	CE1	PHE	375 A /	5591	CA	GLY	828 B	3.82		
34.	1206	CE2	PHE	375 A /	5592	C	GLY	828 B	3.48		
35.	1206	CE2	PHE	375 A /	5593	O	GLY	828 B	3.27		
36.	1206	CE2	PHE	375 A /	7042	CE1	PHE	978 B	3.48		
37.	1206	CE2	PHE	375 A /	7074	O	GLY	981 B	3.84		
38.	1206	CE2	PHE	375 A /	7077	CA	PHE	982 B	3.63		
39.	1206	CE2	PHE	375 A /	7078	C	PHE	982 B	3.61		
40.	1206	CE2	PHE	375 A /	7079	O	PHE	982 B	3.11		
41.	1207	CZ	PHE	375 A /	5565	CA	SER	825 B	3.58		
42.	1207	CZ	PHE	375 A /	5566	C	SER	825 B	3.80		
43.	1207	CZ	PHE	375 A /	5567	O	SER	825 B	3.13		
44.	1207	CZ	PHE	375 A /	5569	OG	SER	825 B	3.22		
45.	1207	CZ	PHE	375 A /	5592	C	GLY	828 B	3.78		
46.	1207	CZ	PHE	375 A /	7077	CA	PHE	982 B	3.75		
47.	1212	O	VAL	376 A /	7101	CG	ASN	984 B	3.67		
48.	1212	O	VAL	376 A /	7103	OD1	ASN	984 B	3.59		
49.	1212	O	VAL	376 A /	7102	ND2	ASN	984 B	3.83		
50.	1222	CG	GLU	377 A /	5623	NH1	ARG	831 B	3.86		
51.	1222	CG	GLU	377 A /	7093	OG	SER	983 B	3.50		
52.	1222	CG	GLU	377 A /	7103	OD1	ASN	984 B	3.89		
53.	1223	CD	GLU	377 A /	5623	NH1	ARG	831 B	3.65		
54.	1223	CD	GLU	377 A /	7093	OG	SER	983 B	3.74		
55.	1225	OE2	GLU	377 A /	5623	NH1	ARG	831 B	2.95		
56.	1225	OE2	GLU	377 A /	7051	CG	ARG	979 B	3.82		
57.	1225	OE2	GLU	377 A /	7093	OG	SER	983 B	3.31		
58.	1278	CG	GLU	383 A /	5624	NH2	ARG	831 B	3.88		
59.	1281	OE2	GLU	383 A /	5624	NH2	ARG	831 B	3.79		
60.	1303	NH2	ARG	385 A /	6082	CG	PRO	878 B	3.64		
61.	1314	CB	ALA	386 A /	5624	NH2	ARG	831 B	3.34		
62.	1319	O	GLU	387 A /	5614	N	ARG	831 B	3.87		
63.	1319	O	GLU	387 A /	5615	CA	ARG	831 B	3.39		
64.	1319	O	GLU	387 A /	5619	CG	ARG	831 B	3.83		
65.	1321	CG	GLU	387 A /	5642	O	ILE	833 B	3.54		
66.	1322	CD	GLU	387 A /	5642	O	ILE	833 B	3.70		
67.	1324	OE2	GLU	387 A /	5641	C	ILE	833 B	3.75		
68.	1324	OE2	GLU	387 A /	5642	O	ILE	833 B	3.00		
69.	1324	OE2	GLU	387 A /	5650	C	ARG	834 B	3.41		
70.	1324	OE2	GLU	387 A /	5651	O	ARG	834 B	3.27		
71.	1324	OE2	GLU	387 A /	5665	N	SER	835 B	3.38		
72.	1324	OE2	GLU	387 A /	5666	CA	SER	835 B	3.22		
73.	1324	OE2	GLU	387 A /	5679	CD	PRO	836 B	3.88		
74.	1327	CA	LEU	388 A /	5619	CG	ARG	831 B	3.31		
75.	1328	C	LEU	388 A /	5619	CG	ARG	831 B	3.78		
76.	1329	O	LEU	388 A /	5581	O	GLN	827 B	3.35		
77.	1329	O	LEU	388 A /	5614	N	ARG	831 B	3.67		
78.	1329	O	LEU	388 A /	5615	CA	ARG	831 B	3.84		
79.	1329	O	LEU	388 A /	5619	CG	ARG	831 B	3.38		
80.	1336	CA	PRO	389 A /	5581	O	GLN	827 B	3.79		
81.	1336	CA	PRO	389 A /	5583	CG	GLN	827 B	3.59		
82.	1339	CB	PRO	389 A /	5583	CG	GLN	827 B	3.33		
83.	1339	CB	PRO	389 A /	5584	CD	GLN	827 B	3.72		
84.	1339	CB	PRO	389 A /	5586	OE1	GLN	827 B	3.33		
85.	1342	N	LEU	390 A /	5581	O	GLN	827 B	3.80		
86.	1342	N	LEU	390 A /	5583	CG	GLN	827 B	3.53		
87.	1344	C	LEU	390 A /	5584	CD	GLN	827 B	3.82		
88.	1344	C	LEU	390 A /	5585	NE2	GLN	827 B	3.85		
89.	1345	O	LEU	390 A /	5583	CG	GLN	827 B	3.46		
90.	1345	O	LEU	390 A /	5584	CD	GLN	827 B	3.16		
91.	1345	O	LEU	390 A /	5586	OE1	GLN	827 B	3.80		
92.	1345	O	LEU	390 A /	5585	NE2	GLN	827 B	2.95		
93.	1346	CB	LEU	390 A /	5608	CB	GLU	830 B	3.43		
94.	1346	CB	LEU	390 A /	5609	CG	GLU	830 B	3.83		
95.	1348	CD1	LEU	390 A /	5646	CD1	ILE	833 B	3.47		
96.	1351	N	ALA	391 A /	5586	OE1	GLN	827 B	3.83		
97.	1352	CA	ALA	391 A /	5584	CD	GLN	827 B	3.64		
98.	1352	CA	ALA	391 A /	5586	OE1	GLN	827 B	3.44		
99.	1352	CA	ALA	391 A /	5585	NE2	GLN	827 B	3.46		
100.	1355	CB	ALA	391 A /	5586	OE1	GLN	827 B	3.38		
101.	2012	OG1	THR	462 A /	5586	OE1	GLN	827 B	3.40		
102.	2030	OG1	THR	464 A /	5586	OE1	GLN	827 B	3.75		
103.	2029	CG2	THR	464 A /	5584	CD	GLN	827 B	3.64		
104.	2029	CG2	THR	464 A /	5586	OE1	GLN	827 B	3.16		
105.	2074	CG1	VAL	469 A /	7096	N	ASN	984 B	3.44		
106.	2074	CG1	VAL	469 A /	7097	CA	ASN	984 B	3.83		
107.	2074	CG1	VAL	469 A /	7100	CB	ASN	984 B	3.33		
108.	2074	CG1	VAL	469 A /	7107	N	SER	985 B	3.56		
109.	2075	CG2	VAL	469 A /	7107	N	SER	985 B	3.86		
110.	2075	CG2	VAL	469 A /	7111	CB	SER	985 B	3.50		
111.	2077	N	ARG	470 A /	7111	CB	SER	985 B	3.72		
112.	2079	C	ARG	470 A /	7100	CB	ASN	984 B	3.44		
113.	2080	O	ARG	470 A /	7100	CB	ASN	984 B	3.28		
114.	2080	O	ARG	470 A /	7101	CG	ASN	984 B	3.61		
115.	2080	O	ARG	470 A /	7102	ND2	ASN	984 B	2.99		
116.	2082	CG	ARG	470 A /	7111	CB	SER	985 B	3.76		
117.	2082	CG	ARG	470 A /	7112	OG	SER	985 B	3.88		
118.	2094	N	GLU	471 A /	7100	CB	ASN	984 B	3.53		
119.	2095	CA	GLU	471 A /	7100	CB	ASN	984 B	3.74		
120.	2098	CB	GLU	471 A /	7097	CA	ASN	984 B	3.37		
121.	2098	CB	GLU	471 A /	7098	C	ASN	984 B	3.47		
121.	2098	CB	GLU	471 A /	7099	O	ASN	984 B	3.76		
123.	2098	CB	GLU	471 A /	7100	CB	ASN	984 B	2.78		
124.	2098	CB	GLU	471 A /	7101	CG	ASN	984 B	3.47		
125.	2098	CB	GLU	471 A /	7102	ND2	ASN	984 B	3.60		
126.	2100	CD	GLU	471 A /	7100	CB	ASN	984 B	3.84		
127.	2100	CD	GLU	471 A /	7101	CG	ASN	984 B	3.71		
128.	2100	CD	GLU	471 A /	7102	ND2	ASN	984 B	3.87		



129.	2101	OE1	GLU	471	A	/	7097	CA	ASN	984	B	3.72
130.	2102	OE2	GLU	471	A	/	7101	CG	ASN	984	B	3.66
131.	2102	OE2	GLU	471	A	/	7102	ND2	ASN	984	B	3.48
132.	2116	ND2	ASN	473	A	/	7102	ND2	ASN	984	B	3.26
133.	2559	OE1	GLU	520	A	/	6451	CA	GLY	916	B	3.75
134.	2559	OE1	GLU	520	A	/	6455	N	ILE	917	B	3.14
135.	2955	O	SER	565	A	/	6460	CG1	ILE	917	B	3.60
136.	2955	O	SER	565	A	/	6462	CD1	ILE	917	B	3.32
137.	2961	CA	ARG	566	A	/	6462	CD1	ILE	917	B	3.87
138.	2977	N	THR	567	A	/	7118	O	SER	986	B	3.40
139.	2978	CA	THR	567	A	/	7099	O	ASN	984	B	3.81
140.	2978	CA	THR	567	A	/	7115	N	SER	986	B	3.76
141.	2978	CA	THR	567	A	/	7118	O	SER	986	B	3.41
142.	2979	C	THR	567	A	/	7118	O	SER	986	B	3.80
143.	2980	O	THR	567	A	/	6460	CG1	ILE	917	B	3.79
144.	2981	CB	THR	567	A	/	7099	O	ASN	984	B	3.72
145.	2982	CG2	THR	567	A	/	7108	CA	SER	985	B	3.22
146.	2982	CG2	THR	567	A	/	7111	CB	SER	985	B	3.71
147.	2982	CG2	THR	567	A	/	7112	OG	SER	985	B	3.67

Number of hydrogen bonds: 4  
Number of non-bonded contacts: 147