

TESIS DOCTORAL

Gloria Navarro Cerrillo

2012

**Estudio de una superfamilia de genes de
respuesta a patógenos (*repat*) en insectos.**

Directores: **Dr. Salvador Herrero Sendra**

Profesor Titular de la Universidad
Departamento de Genética
ERI de Biotecnología y Biomedicina
Universidad de Valencia

Dr. Juan Ferré Manzanero

Catedrático de Universidad
Departamento de Genética
ERI de Biotecnología y Biomedicina
Universidad de Valencia



Dr. D. Salvador Herrero Sendra, Profesor Titular del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València, y

Dr. D. Juan Ferré Manzanero, Catedrático del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València,

INFORMAN:

Que Dña. Gloria Navarro Cerrillo, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación recogido en esta memoria que lleva por título “Estudio de una superfamilia de genes de respuesta a patógenos (repat) en insectos”, para optar al Grado de Doctor por la Universitat de València.

Y para que así conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firman la presente en Burjassot, a 18 de abril de 2012.

Director: Dr. D. Salvador Herrero Sendra Director: Dr. D. Juan Ferré Manzanero

Tutora: Dra. Dña. Nuria Paricio Ortiz

AGRADECIMIENTOS

Siempre se dice que lo último en escribir en una tesis son los agradecimientos y que es complicado. Así que a día de hoy, con menos de 40 páginas del manuscrito escritas, he decidido empezar a acordarme de todos aquellos que de una forma u otra han hecho posible el final de todo esto. Sé que este texto sufrirá modificaciones en los próximos meses, pero es algo que necesito empezar a hacer. Para mi, esta tesis no ha sido sólo un aprendizaje a nivel científico, también ha sido un gran aprendizaje a nivel personal.

Salva, no sé por donde empezar... Gracias por darme la oportunidad de realizar esta tesis y de vivir todas estas experiencias. Gracias por tus consejos, por emocionarte y decepcionarte conmigo, por darme la oportunidad de equivocarme por mi misma y aprender de ello, e incluso gracias por tus broncas (algunas bien merecidas). Pero sobretodo, gracias por tu apoyo y tu guía personal en este camino lleno de piedras que hemos vivido. Creo que los dos hemos aprendido mucho estos años. Tampoco se me olvida todo tu apoyo a nivel emocional, que tanto me ha ayudado en los momentos más difíciles.

Juan, gracias por todas las revisiones, por ese punto crítico que tantas veces nos ha hecho falta, y por todo lo que he aprendido de ti. Sin tu implicación esto no habría sido posible. Gracias por compartir parte de esa magia que te ilusiona cada día.

Balta, me gustaría agradecerte que siempre estuvieses dispuesto a dar tu opinión sobre las cosas y a hacernos partícipes de las decisiones a la vez que responsables,

Patri, desde ese primer día mío en el laboratorio, donde empecé a trabajar contigo y tus clones para los macroarrays, nos han pasado muchas cosas: nos hemos ilusionado juntas, sufrido decepciones, imaginado nuevos experimentos, nos hemos quedado hasta tarde con la ilusión de ver un resultado, compartido nervios en los congresos... Tengo muchísimas cosas que agradecerte porque siempre has estado a mi lado, tanto a nivel profesional como personal, me siento realmente afortunada de que nuestros caminos un día se cruzaran. He tenido la suerte de tenerte como apoyo cuando lo he necesitado sin pedírtelo, de darme el empujoncito que me hacía

falta y el tirón de orejas cuando era necesario. Así que por un sinfín de motivos, gracias Patri.

Rosi, no sabría cómo agradecerte todos los momentos que hemos compartido tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias por apoyarme y escucharme, por nuestras largas conversaciones sobretodo en la cámara de bichos, y por cuando sin hablar nos hemos entendido. En definitiva, gracias por tu amistad, un regalo de valor incalculable.

Agata, para mí desde el momento que llegaste cambiaron muchas cosas. Estoy muy agradecida por todo lo que he aprendido de ti, por toda esa ayuda que me has ofrecido siempre, por hacer simples las cosas que parecían más complicadas y poner algo de luz cuando lo veía todo oscuro. Siempre te he considerado un ejemplo de vida.

Cris, ese osito de peluche llegado desde Italia, gracias por ser como eres, por un lado aportando esos momentos de cariño y ternura que tanto bien me han hecho, por otro lado, por esas aventuras y momentos de locura que hemos compartido. Gracias por ser mi amiga.

Sara y Yolanda, gracias por ser como unas mamis dentro del laboratorio y por enseñarme actitudes científicas de gran valor para mí. Y aunque creo que a veces no os lo he sabido expresar, muchísimas gracias por los momentos personales que llevo guardados en mi corazón.

Manoli, mi primera y única colaboradora... hemos compartido muchas alegrías y tristezas en el laboratorio. Espero que aprendieses y disfrutases, y que lo sigas haciendo en tu camino. Gracias por soportarme en algunos momentos y por esas "charradas" que hemos tenido. Y aun sabiendo que me quedo corta, mil millones de gracias.

Maria, mi pequeña gran amiga. Gracias por todas esas "broncas" aunque sólo te hiciera caso un 10% de las veces, pero siempre te escuchaba. Te deseo mucha suerte en la aventura que empiezas, aunque sé que no te va a hacer falta.

A todas mis compañeras con las que no he compartido ya tanto laboratorio pero sí muchas otras cosas: Nuria, Maissa, Leila y Camila. Tampoco me olvido de aquellas personas que en algún momento se cruzaron nuestras vidas en este laboratorio pero ya no están aquí: Ezequiel, Najara, la pequeña gourmet italiana Silvia y muy especialmente a Juli, que se llevó un pedacito de mi corazón en la maleta a Brasil.

No quiero dejarme ni a David ni a Ivan, ni muchos de los momentos que hemos vivido juntos, momentos que marcaron el principio de esta aventura. Ivan, gracias por hacerme reír incluso en los momentos de mayor estrés. David, aunque te parezca raro, gracias por todas esas discusiones durante el primer año pues he aprendido mucho de ellas, discusiones que siempre acabaron bien.

No me olvidaría jamás de donde empecé en el departamento de Genética, ni de aquellos que me enseñaron las primeras cosas en un laboratorio de investigación, el laboratorio de Molecular. Gracias a Juanan y a Olga especialmente, que se encargaron de enseñarme en mis inicios. Y no me olvido de aquellos con quien he compartido también momentos durante estos años de tesis: Jose Luis, Josep, Amparo, Sirena, y especialmente, de mi amigo siempre ocupado, Javi (gracias por todos esos momentos de confianzas y sufrimientos compartidos...).

Gracias a los compañeros de GMD y BioMol, por todos estos años compartidos, me habéis prestado ayuda y conocimientos cuando los he necesitado. También me gustaría hacer extensivo este agradecimiento a todos los compañeros del departamento por su aportación a la experiencia que ha llevado a la escritura de esta tesis y por todos los momentos vividos. Este departamento es un lugar muy especial por las personas que forman parte de él.

Tampoco me puedo olvidar de todos los compañeros del inicio de esta aventura, mis compañeros del máster. Juntos aprendimos, y juntos sufrimos.

Hoy escribo otro poco de esta gran lista de agradecimientos... y me pongo algo melancólica. Los 6 meses de estancia en Suiza me ayudaron a conocerme mejor, me aportó mucho en mi vida. Por un lado, compartí horas de laboratorio e inquietudes científicas que realmente me han servido de mucho. Gracias a todo el UPLEM y gracias especialmente a Bruno Lemaitre por darme esa oportunidad. Gracias a Taka por todo lo que compartimos, por todo lo que me enseñaste. Por otro lado, a nivel personal tengo todavía más cosas que agradecer. Me enriqueció mucho encontrarme con cada uno de vosotros y me encontré con grandes AMIGOS tanto dentro como fuera del laboratorio. Nunca se borrarán de mi memoria los cafés de después de comer y de por la tarde en los sofás, las cervezas de los jueves, las barbacoas... y especialmente esos fines de semana que Onya y Lionel me soportaban. Tengo muy buenos recuerdos de los meses que compartí allí y no sabría con cual quedarme. Sé que escribiéndolo en español sólo unos pocos lo entenderán, pero es la mejor forma

en la que me puedo expresar, así que por lo menos que quede el mensaje final: I would like to thank all my friends I met in Switzerland in 2009, you are going to be in my heart for all my life.

Juanma, quién nos iba a decir cuando nos conocimos en primero de biología que compartiríamos tantos momentos. Nos hemos ido formando juntos, compartiendo clases, prácticas, horas de biblioteca y de cafetería, así como múltiples actos sociales. Gracias por compartir conmigo tu pasión por la ciencia, tus inquietudes y tus conocimientos, tus críticas siempre constructivas, las risas y los mosqueos, pero lo más importante: gracias por tu amistad y tu cariño, sobretodo me lo has demostrado cuando más lo he necesitado, y sé que aunque el futuro nos lleve por caminos que se separen siempre nos tendremos el uno al otro.

A Migue, Miriam, Eva, Ana y Mayte, mis grandes amigos de la carrera de biología. Junto a vosotros he vivido grandes momentos que nunca olvidaré desde los primeros meses de la carrera hasta el día de hoy. Habéis ido conociéndome y me habéis demostrado nuestra amistad con creces, tanto en los buenos como en los malos momentos. Muchísimas gracias por todo lo que nosotros sabemos. Os quiere vuestra pequeña hostil.

Mis amigas, algunas más presentes en mi vida en estos momentos que otras. Los caminos de algunas de nosotras se cruzaron cuando éramos pequeñas y ya no nos pudimos separar. Otros caminos se cruzaron durante la adolescencia, y aunque a veces parece que cada una siga el suyo propio, yo sé que habéis estado y estáis ahí.

Como todos sabéis, a la gente de mi falla, la Falla de Pere, la llevo en el corazón, es mi gran familia y en la cual tengo muchos y grandes amigos, especialmente a mis princesas. Gracias por haber soportado mis rarezas cuando no las habéis entendido, gracias por todos esos momentos que llevamos acumulados año tras año de amistad, y por haber hecho realidad uno de mis sueños en el 2008.

Luis, a pesar de todo y por todo, no podrías quedarte fuera de mis agradecimientos. Conmigo has vivido mis momentos de estudio durante la carrera, has sufrido la mayor parte de mi tesis, me has apoyado en muchos de mis sueños aunque no los compartieras, y has soportado mi ajetreada agenda además de mis múltiples viajes. Gracias por intentar tranquilizarme cuando me hacía falta, por esas horas de fin de semana y festivos que me has acompañado al laboratorio, gracias por sobrellevar mis nervios, apoyarme cuando me sentía decepcionada y

triste, y por aguantarme cuando llegaba emocionada a casa con mis últimas novedades. Hemos vivido muchísimas cosas juntos, eres parte de esta tesis.

Oscar, hace poco que se cruzaron nuestros caminos pero tengo mucho que agradecerte. Desde el principio viste en mí más potencial del que yo veía, creíste en mí sin motivos y sin conocerme mucho. Gracias por transmitirme esa creencia en mí misma y hacerme sacar la energía interior que necesitaba desde hacía tiempo y sólo tú has conseguido. También te agradezco por haberme quitado la venda de mis ojos y por hacerme ver la realidad cuando lo necesité, de permanecer a mi lado y por todos esos momentos imborrables que hemos compartido. Gracias por todo lo que tú y yo sabemos, por hacer brillar mis ojos en la oscuridad. Te quiero y quiero dedicarte esta tesis, tú me distes las fuerzas para que la acabara.

Mi familia, siempre apoyándome, sufriendome (y os puedo asegurar que han sufrido mucho conmigo) e intentando hacerme la vida más fácil. Ellos no sólo han compartido mis sueños desde que era pequeña hasta el presente, sino que también han hecho realidad todos aquellos que estaban en sus manos. Podría pasarme el resto de mi vida agradeciéndolos, sois los máximos responsables de esta tesis y de mi persona, gracias papás y tete. Así que os diré que os quiero muchísimo una vez más.

Para acabar me gustaría dejar una frase con la que me tropecé en el transcurso de esta tesis y en la cual veo reflejada mi vida y sobretodo los últimos años...

“La vida no es esperar a que pase la tormenta, es aprender a bailar bajo la lluvia”.

Gracias por enseñarme a bailar bajo la lluvia.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN/SUMMARY	13
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. Entomopatógenos	23
1.1.1. Bacterias entomopatógenas	23
1.1.2. Virus entomopatógenos	30
1.1.3. Hongos entomopatógenos	33
1.1.4. Nematodos entomopatógenos	34
1.1.5. Protozoos entomopatógenos	35
1.2. Interacción insecto-patógeno	35
1.2.1. Elementos sensores de patógenos	37
1.2.2. Regulación de la respuesta: las rutas de señalización	39
1.2.3. Componentes efectores de la respuesta inmune humoral y celular de insectos	43
1.2.4. El intestino de lepidópteros como barrera	47
1.3. <i>Spodoptera exigua</i>	49
1.3.1. Medidas de control en campo	51
1.3.2. Respuesta de patógenos en <i>S. exigua</i>	52
1.4. Genes <i>repat</i>	53
2. OBJETIVOS	57
3. CHAPTER 1: High expression of novel <i>repat</i> genes in a Bt- resistant colony.	61
3.1. Introduction	63
3.2. Materials and Methods	65
<i>S. exigua</i> colonies, insect rearing and bioassays	65
Cloning and sequencing of novel <i>repat</i> genes	66
Quantitative Real Time PCR (RT-qPCR)	67
Analysis of correlation between gene expression and resistance	68
3.3. Results	69
3.3.1. Three new members of the REPAT family	69
3.3.2. Reversion of the resistance in Xen-RU colony	70
3.3.3. <i>Repat5</i> and <i>arylphorin</i> overexpression correlates with resistance to Xentari™.	72
3.3.4. <i>Repat5</i> overexpression correlates with <i>arylphorin</i> expression	73
3.4. Discussion	74
4. CHAPTER 2: Functional interactions between members of the REPAT family of insect-induced proteins.	77
4.1. Introduction	79
4.2. Materials and Methods	80
Insect rearing	80
Yeast two-hybrid screening	80
Plasmid constructions and fluorescence microscopy	81
Microbial toxins and bacterial treatments	82
Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)	83
4.3. Results	84
Identification of REPAT1- interacting proteins	84

Cellular localization of REPAT1 and REPAT8	85
Expression profile of <i>Repat</i> genes in response to pathogens	87
4.4. Discussion	89
5. CHAPTER 3: A new gene superfamily of pathogen-response (<i>repat</i>) genes, classification and expression analysis.	93
5.1. Introduction	95
5.2. Materials and Methods	96
Insect rearing	96
Data mining for <i>repat</i> and <i>repat</i> -like sequences	96
Phylogenetic and MEME motif analysis	97
Insect treatments	98
Isolation of stem cells from larval midgut	98
Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)	99
Determination of midgut cell proliferation rate	99
5.3. Results	101
New members of the REPAT family	101
Midgut expression in response to different bacteria-related treatments	108
Differential expression of <i>repat</i> genes in stem midgut stem cells	110
Midgut proliferation rate did not show differences between treatments	112
5.4. Discussion	113
6. CHAPTER 4: <i>Repat</i> homologs in <i>D. melanogaster</i>.	117
6.1. Introduction	119
6.2. Materials and Methods	120
In <i>silico</i> data-expression analysis of <i>CG13323</i> and <i>CG13324</i> .	120
Knock out construction by FLP-FRT deletion	121
Over-expressing mutants construction	122
DNA isolation and PCR	122
Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)	123
Bacterial strains and infection experiments	123
6.3. Results	124
<i>CG13323</i> and <i>CG13324</i> share characteristics with <i>S. exigua repat</i> genes.	124
Generation of knock out mutants.	125
Generation of over-expressing mutants.	126
Effect of deletion of <i>CG13323</i> and <i>CG13324</i> on the susceptibility to bacterial infection.	127
Effect of <i>CG13323</i> over-expression on the susceptibility to bacterial infection.	128
6.4. Discussion	130
7. DISCUSIÓN GENERAL	133
8. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	143
9. BIBLIOGRAFÍA	149
10. ANEXOS	173
10.1. Anexo 1: Dietas y medios de cultivo	175
10.2. Anexo 2: Vectores	178

Resumen

Summary

RESUMEN

El intestino de los insectos es una de las principales vías de entrada de entomopatógenos. Con el fin de minimizar los efectos negativos de los patógenos, el intestino de los insectos posee diferentes mecanismos: síntesis de péptidos antimicrobianos, producción de especies reactivas de oxígeno, activación de los sistemas de reparación y detoxificación, melanización, fagocitosis, apoptosis y la renovación celular, entre otros. Estudios de expresión tras la exposición a diferentes patógenos han mostrado cómo la expresión de ciertos genes varía en el intestino tras la infección. Previamente a la realización de esta tesis, se identificó, en el lepidóptero *Spodoptera exigua*, una familia de genes que aumentaba sus niveles de expresión en el intestino tras la exposición a la toxina Cry1Ca de *Bacillus thuringiensis* y a baculovirus. Esta familia, compuesta por cuatro miembros en su inicio, se denominó *repat* (por **resp**uesta a **pat**ógenos).

Al comienzo de esta tesis no se disponía de información sobre el papel de estos genes en la respuesta a patógenos. Es por ello que el objetivo principal de esta tesis ha consistido en profundizar en el conocimiento sobre la familia REPAT, tanto en el estudio de su función a nivel molecular como en determinar sus implicaciones en la respuesta del intestino de los insectos a distintos microorganismos entomopatógenos y sus factores de virulencia.

En un primer capítulo, la comparación a nivel transcripcional entre una población de *S. exigua* susceptible y otra resistente, a un producto comercial basado en *B. thuringiensis* (Xentari™), mostró una elevada expresión constitutiva de cuatro genes *repat* en la población resistente. Tres de estos genes *repat* eran nuevos, se secuenciaron y se nombraron como *repat5*, *repat6* y *repat7*. Además, se observó una correlación positiva entre la expresión de *repat5* y la resistencia al producto Xentari™.

En un segundo capítulo tratamos de aproximarnos a la función molecular de estos genes a través del estudio de las proteínas que interaccionan con REPAT1 mediante la técnica del doble híbrido. Para ello se construyó una genoteca que contiene los genes que se expresan en el intestino de larvas de quinto estadio de *S. exigua*. En los experimentos de doble híbrido en levaduras se observó que dos proteínas interaccionaban con REPAT1. Estas proteínas eran REPAT4 y una nueva proteína similar a ésta, que se secuenció y se nombró como REPAT8. En estudios de localización celular se observó que REPAT1 se encuentra en el citoplasma celular, pero en presencia de REPAT8 aparece también en el núcleo. El análisis de la expresión de los ocho genes descritos hasta el momento mostraron una respuesta general a los tratamientos relacionados con *B. thuringiensis* (toxina Cry1Ca, Xentari™

y una cepa de *B. thuringiensis* que no produce toxinas Cry, Bt cry-) y no frente a otros tratamientos con bacterias no patógenas (*Escherichia coli*, *Enterococcus spp.* y otras presentes en su microbiota), sugiriendo que la expresión de estos genes se activa principalmente en respuesta al daño celular.

En un tercer capítulo, aprovechando la reciente secuenciación del transcriptoma de *S. exigua* por parte de nuestro grupo, tratamos de identificar nuevos genes *repat*. El análisis del transcriptoma reveló la presencia de al menos 46 miembros diferentes. El análisis de estas secuencias mostró la presencia de ciertos motivos conservados, así como la posible clasificación de sus miembros en dos grandes clases: α REPATs y β REPATs. Además, en este capítulo estudiamos la expresión de esta superfamilia de genes, observando un cambio en la expresión en intestino de los *arepats* tras la intoxicación con Cry1Ca pero no en respuesta a un aumento de la microbiota en el intestino de las larvas. Interesantemente, al estudiar la expresión de estos genes en las células madre del intestino (en comparación a la expresión en el intestino completo), las larvas con mayor carga bacteriana mostraron un mayor número de genes *repat* expresados en estas células madre. El aumento del número de genes *repat* en *S. exigua* ha permitido la identificación de homólogos en otras especies de insectos: *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera litura*, *Mamestra configurata*, *Mamestra brassicae*, *Helicoverpa armigera*, *Bombyx mori* y en el díptero *Drosophila melanogaster*.

En el organismo modelo *D. melanogaster* se identificaron dos homólogos: CG13323 y CG13324. Dado que en *Drosophila* existen herramientas moleculares no disponibles para *S. exigua*, se decidió estudiar la función de estos homólogos para profundizar en el conocimiento de estos genes. Para ello se obtuvo, tanto un mutante con la delección de CG13323 y CG13324, como mutantes de sobreexpresión de CG13323. El mutante con ambos genes delecionados mostró un aumento en la supervivencia a la infección con *Pseudomonas entomophila*, lo cual resultó contrario al resultado esperado, ya que los genes han mostrado aumento de su expresión después de la infección. También se observó un aumento en la supervivencia, tanto de larvas como de adultos, en los mutantes que sobreexpresan CG13323. Para comprobar si CG13323 estaba implicado en alguna de las rutas del sistema inmune de *D. melanogaster*, se estudió la expresión de algunos genes marcadores (*diptericina* de la ruta Imd, *upd3* de la ruta JAK-STAT y *vein* de la ruta EGF), no encontrándose ningún cambio relacionado con la sobreexpresión de CG13323 que nos permitiera situar los genes *repat* en algunas de las principales rutas del sistema inmune de insectos.

Debido a las características de los genes repat y las proteínas que codifican: la gran cantidad miembros de la misma familia, su diferente respuesta a nivel de expresión, el pequeño tamaño de las proteínas, la interacción entre miembros de la misma familia que produce su translocación nuclear, y la homología de alguno de sus miembros a factores transcripcionales como es MBF2, sugieren la posibilidad de que diferentes combinaciones de proteínas REPAT podrían ser responsables de la regulación de la transcripción de genes implicados en distintos aspectos de la fisiología del insecto.

SUMMARY

The insect gut is one of the main routes of entrance of entomopathogens. In order to minimize the negative effects from pathogens, insect gut possesses several mechanisms: synthesis of antimicrobial peptides, production of reactive oxygen species, activation of repair and detoxification systems, melanization, phagocytosis, apoptosis and cell renewal, among others. Expression analysis has shown differences in the transcription profile of certain genes in the insect gut due to the exposure to different pathogens. Prior to the start of this thesis, a family of genes was identified in the lepidopteran *Spodoptera exigua* by their increased expression in midgut after exposure to Cry1Ca toxin from *Bacillus thuringiensis* and to baculovirus infection. This family, initially composed by four members, was named REPAT (in REsponse to PAThogens).

At the beginning of this thesis, no information about the molecular function of this new family of genes was available. With the current thesis we plan to increase our knowledge about the REPAT family and its implications in the insect gut response to entomopathogenic microorganisms and their virulence factors.

In the first chapter, comparing the gene expression profiles of *B. thuringiensis*-resistant and susceptible colonies of *S. exigua*, four *repat* genes showed a higher constitutive expression in the resistant population. Three of these *repat* genes were novel and they were sequenced and named as *repat5*, *repat6* and *repat7*. Moreover, a positive correlation was observed between the expression of *repat5* and the resistance to the Xentari™ product.

In a second chapter we advanced to the molecular function of these genes through the study of proteins that interact with REPAT1 using the yeast two-hybrid technique. With that purpose, we constructed a cDNA library containing genes that are expressed in the midgut of fifth instar larvae of *S. exigua*. In the yeast-two hybrid experiments, two proteins showed interaction with the REPAT1 protein. These proteins were REPAT4 and a novel protein similar to this one, which was sequenced and named REPAT8. In cellular localization studies, REPAT1 was found in the cellular cytoplasm, but in the presence of REPAT8, REPAT1 also appears in the nucleus. The expression analysis of the eight *repat* genes described so far showed an overall response to the treatments related to *B. thuringiensis* (Cry1Ca toxin, Xentari™ and a *B. thuringiensis* strain that does not produce Cry toxins, Bt cry-) but not with the treatments of non-pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Enterococcus spp.* and other present in their microbiota), suggesting that the expression of these genes is activated

mainly in response to cell damage.

In a third chapter, taking advantage of the recent sequencing of the *S. exigua* transcriptome by our group, we tried to identify novel repat genes. The transcriptome analysis revealed the presence of at least 46 different members. Analysis of these sequences showed the presence of certain conserved motifs and their possible classification into two main classes: α REPATs and β REPATs. Also in this chapter we studied the expression of this gene superfamily, observing a change in the expression of arepats in the midgut after exposure to Cry1Ca but not by an increased of microbiota in the larval gut. We studied the *repat* gene expression in midgut stem cells compared with the whole midgut tissue from *S. exigua* larvae. Interestingly, larvae with higher bacterial load in midgut showed a higher number of genes expressed in these stem cells. The increase of the number of sequences in *S. exigua* has allowed the identification of homologs in other insect species: *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera litura*, *Mamestra configurata*, *Mamestra brassicae*, *Helicoverpa armigera*, *Bombyx mori* and the dipteran *Drosophila melanogaster*.

In the model organism *D. melanogaster*, two homologs were identified: *CG13323* and *CG13324*. Since in *Drosophila* there are molecular tools that are not available in *S. exigua*, we decided to study these homologous genes to increase our knowledge about repat genes. With that purpose, two types of mutants were obtained: a mutant with the deletion of *CG13323* and *CG13324*, as well as *CG13323* over-expressing mutants. The mutant with both deleted genes showed an increase in survival to *Pseudomonas entomophila* infection, which was contrary to the expected result because the genes showed increased expression after infection. There was also an increase in the survival of both larvae and adults in *CG13323* over-expressing mutants. To test whether overexpression of *CG13323* was involved in some of the routes of the immune system of *D. melanogaster*, we studied the expression of some marker genes (*dipstericin* for the Imd pathway, *upd3* for the JAK-STAT pathway and *vein* for the EGF pathway), finding no changes related to the over-expression of *CG13323* and enabled us to locate the repat genes in some of the main routes of the insect immune system.

Due to the characteristics of these genes and their encoded proteins: the large number of members of the same family, their different response at the expression level, the small size of the proteins, the interaction between members of the same family that produces nuclear translocation, and the homology of some members with transcriptional factors such as MBF2, suggest the possibility that different combinations of REPAT proteins could be responsible of transcriptional regulation of genes involved in various aspects of the insect physiology.

Introducción

1.1 Entomopatógenos

El término entomopatógeno (entomon: insecto, pathos: enfermedad, gennân: engendrar) hace referencia a agentes causantes de enfermedades infecciosas de los insectos como lo son bacterias, virus, hongos, protozoos y nematodos. La primera descripción de un agente entomopatógeno data de la Grecia clásica (aproximadamente en el 400 a.C.) donde ya se conocía la enfermedad de las abejas (*Apis mellifera*) conocida como Ascoferosis, enfermedad producida por el hongo *Ascophaera apis*. Más tarde, en la Edad Media se citan varias enfermedades infecciosas que sufre el gusano de la seda (*Bombyx mori*) y en el siglo XVIII, un entomólogo francés, René Reaumur, describió un hongo patógeno de noctuidos. Más recientemente, a principios del siglo XIX, Agostino Bassi estudia una enfermedad que afectaba a *B. mori* conocida como la muscardina y demostró que era producida por un hongo patogénico: *Beauveria bassiana*.

Estos entomopatógenos, al causar enfermedades en insectos plaga resultan interesantes por su posible potencial para ser utilizados como agentes de control biológico. Los entomopatógenos utilizados como insecticidas, además de ser enemigos naturales de los insectos plaga no tienen la desventaja de los residuos tóxicos que sí presentan los insecticidas químicos además de que son compatibles con la fauna auxiliar. De entre los organismos entomopatógenos los más destacados son bacterias, virus, nematodos, hongos y protozoos.

1.1.1 Bacterias entomopatógenas

Las bacterias son organismos unicelulares procariotas y existen numerosas especies de bacterias que producen efectos patogénicos en otros organismos, entre ellos los insectos. Las bacterias entomopatógenas generalmente infectan al insecto por vía oral y cuando consiguen alcanzar la hemolinfa proliferan causando la destrucción de los tejidos del insecto y su septicemia. Estas bacterias se podrían distinguir en dos grupos: las bacterias formadoras de esporas y las bacterias no formadoras de esporas. Estas últimas suelen habitar en el tubo digestivo de los insectos y son potencialmente patogénicas porque cuando consiguen penetrar al hemocele por otras causas, provocan así la septicemia. Estas bacterias pueden atravesar la barrera del intestino por la acción de otros patógenos, por temperaturas extremas, por inanición, daños en el intestino, etc.

El otro grupo de bacterias entomopatógenas, las bacterias formadoras de esporas, son bacterias gram-positivas y suelen producir toxinas para penetrar o aniquilar de forma eficiente al insecto. Entre las bacterias entomopatógenas, el género

Bacillus es el más importante, en el cual se encuentra *Bacillus thuringiensis*. Esta bacteria está estrechamente relacionada con otras especies de bacterias como *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* y *Bacillus mycoide* (Priest, *et al.*, 2004). Durante la esporulación *B. thuringiensis* presenta una o varias inclusiones cristalinas (Figura 1) que están constituidas por una o varias clases de proteínas denominadas δ -endotoxinas, las cuales poseen actividad tóxica para ciertas especies de insectos (Schnepf, *et al.*, 1998). La morfología del cristal paraesporal de *B. thuringiensis* varía según las proteínas que lo forman, pudiéndose observar cristales bipiramidales, cúbicos, esféricos, irregulares, rectangulares, romboidales y triangulares. El tamaño de los cristales oscila desde los 350 nm de diámetro de algunos cristales irregulares a los 2 μ m de longitud en muchos bipiramidales.

B. thuringiensis está presente de forma natural y ubicua en el medio ambiente, ya que su spora es capaz de mantener su viabilidad durante años, incluso en condiciones de poca humedad y temperatura elevada. *B. thuringiensis* ha sido aislada de diferentes hábitats, principalmente a partir de suelo (Martínez y Caballero, 2002, de Lucca *et al.*, 1981) aunque también se han obtenido aislados de plantas (Iriarte y Caballero, 2001), lugares de cría de insectos (Ohba y Aratake, 1994, Damgaard, 2000), agua (Iriarte *et al.*, 2000), restos de insectos muertos (Apoyolo, *et al.*, 1995, Hernandez, *et al.*, 2005) y granos almacenados (Meadows, *et al.*, 1992).

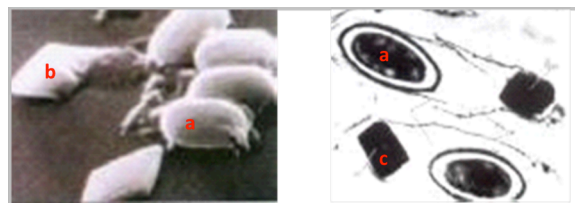


Figura 1. Micrografías electrónicas de *B. thuringiensis*: (a) endospora, (b) cristal bipiramidal, (c) cristal rectangular.

B. thuringiensis posee la capacidad de producir una gran cantidad de factores de virulencia y compuestos tóxicos, algunos de ellos específicos contra invertebrados como las δ -endotoxinas. La presencia de los factores de virulencia es dependiente de la cepa de *B. thuringiensis*. En la actualidad se han descrito tres tipos de proteínas producidas por *B. thuringiensis* que muestran actividad insecticida, estas proteínas se conocen como Cry, Cyt y Vip. Las proteínas Vip (Vegetative Insecticidal Proteins) se secretan mayoritariamente durante la fase de crecimiento vegetativo de la bacteria (Estruch, *et al.*, 1996, Shi, *et al.*, 2004) y no forman parte de las inclusiones cristalinas. Las proteínas Cry y Cyt son δ -endotoxinas o proteínas insecticidas cristalinas (ICPs)

que se producen durante la esporulación de algunas cepas de *B. thuringiensis*. Las proteínas Cyt poseen actividad citolítica tanto para células en cultivo en vertebrados como en invertebrados (Thomas, *et al.*, 1983) pero no parecen ser tóxicas tras la ingestión, sin embargo actúan de forma sinérgica con proteínas Cry potenciando su actividad tóxica (de Maagd, *et al.*, 2003, Federici, *et al.*, 2003, Sayyed, *et al.*, 2001). Estas proteínas Cyt no presentan homología con las proteínas Cry y presentan un único dominio que está compuesto por hojas β plegadas recubiertas por dos α -hélices (Li, *et al.*, 1996).

Las proteínas más ampliamente estudiadas de *B. thuringiensis* son las proteínas Cry, que son proteínas globulares con actividad específica contra algunos órdenes de insectos (Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera y Mallofaga) así como para nematodos, ácaros y protozoos (Schnepf, *et al.*, 1998). Se consideran proteínas Cry todas las proteínas cristalinas de *B. thuringiensis* con carácter tóxico, verificable mediante bioensayos, o cualquier proteína con homología en su secuencia a cualquier proteína Cry descrita (Crickmore, *et al.*, 1998). Estas proteínas se producen como protoxinas que deben ser procesadas por las proteasas del intestino medio de los insectos para pasar a su forma activa. Se ha propuesto un modelo estructural común, con tres dominios, para un gran número de proteínas Cry. El dominio I está localizado en el extremo N-terminal y es el implicado en la inserción a la membrana y la posterior formación del poro, el dominio II es el más implicado en el reconocimiento de los receptores específicos de membrana y el dominio III puede participar tanto en dicho reconocimiento como en la unión (de Maagd, *et al.*, 1999, de Maagd, *et al.*, 2003).

Debido a la similitud estructural entre las proteínas Cry se ha propuesto que el mecanismo de acción de estas toxinas debe ser similar para todas ellas, no obstante ha sido estudiado principalmente en larvas de lepidópteros y utilizando proteínas del grupo Cry1A (Bravo, *et al.*, 2007). El primer paso comienza con la ingestión del cristal paraesporal de *B. thuringiensis* por parte de la larva (Schnepf, *et al.*, 1998). Este cristal pasa intacto a través del estomodeo hasta llegar al mesenterón donde se solubiliza debido al pH altamente alcalino existente (Du, *et al.*, 1994) (Figura 2). El pH del intestino medio es un punto crítico, ya que dependiendo de éste algunos cristales se solubilizarán liberando las protoxinas y otros no (Bradley, *et al.*, 1995, Koller, *et al.*, 1992). Tras el paso de solubilización se produce la activación de la protoxina llevada a cabo por las proteasas del intestino. Diferencias en la actividad proteolítica intestinal entre los diferentes insectos puede ejercer cierta influencia en el espectro de toxicidad de una determinada proteína Cry (Forcada, *et al.*, 1999, Oppert, *et al.*, 1994). Una vez la proteína es activada debe atravesar la membrana peritrófica, la cual recubre la

superficie apical de las células epiteliales y protege al intestino de infecciones y de posibles daños mecánicos debidos al paso del alimento (Dow, 1986). Esta membrana está compuesta por fibras de quitina y glicoproteínas, que actúan como filtro físico para moléculas menores de 100kDa (Terra, 2001). Aunque al principio se consideró que la membrana peritrófica era un filtro inerte, actualmente se ha propuesto que puede contener receptores específicos de proteínas Cry, ya que algunas proteínas Cry se unen a ella (Bravo, *et al.*, 1992, Rodrigo-Simon, *et al.*, 2006). La unión de las proteínas a las microvellosidades intestinales tiene lugar a través de receptores específicos. Es por ello que la unión a los receptores es un punto determinante para la especificidad y la toxicidad de las proteínas Cry, e incluso para el desarrollo de resistencia 2002 (Ferre, *et al.*, 2002, Pigott, *et al.*, 2007). Se han caracterizado posibles candidatos a receptores de las proteínas Cry, la mayoría en *Manduca sexta* y empleando toxinas Cry1A, identificándose como posibles receptores la cadherina Bt-R₁ (Vadlamudi, *et al.*, 1993), la aminopeptidasa N (APN) (Knight, *et al.*, 1994, Knight, *et al.*, 1995), la fosfatasa alcalina (ALP) (Jurat-Fuentes, *et al.*, 2004) y glicoconjugados (GCR) (Valaitis, *et al.*, 2001). En estudios recientes se encontró que el transportador ABC también está implicado en la integración de la toxina en la membrana y la formación del poro, al menos en *Heliothis virescens*. (Gahan, *et al.*, 2010)

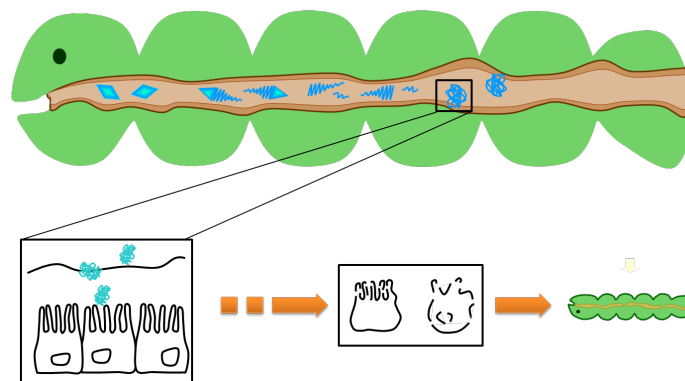


Figura 2. Esquema general del mecanismo de acción de las proteínas Cry. La larva ingiere el cristal que se solubiliza en el intestino medio liberando las protoxinas. A continuación se produce la activación de éstas y las toxinas atraviesan la membrana peritrófica para unirse a las células del intestino. Estas toxinas producirán la muerte celular, y si el daño producido es elevado, acabará produciendo la muerte.

En cuanto a los siguientes pasos en el mecanismo de acción conducentes a la muerte celular existe cierta discrepancia y se han propuesto dos modelos de acción (Figura 3): el primero está basado en la formación de poros (Aronson, *et al.*, 2001,

Bravo, *et al.*, 2004, Whalon, *et al.*, 2003) mientras que el segundo se basa en la transducción de una señal (Zhang, *et al.*, 2006).

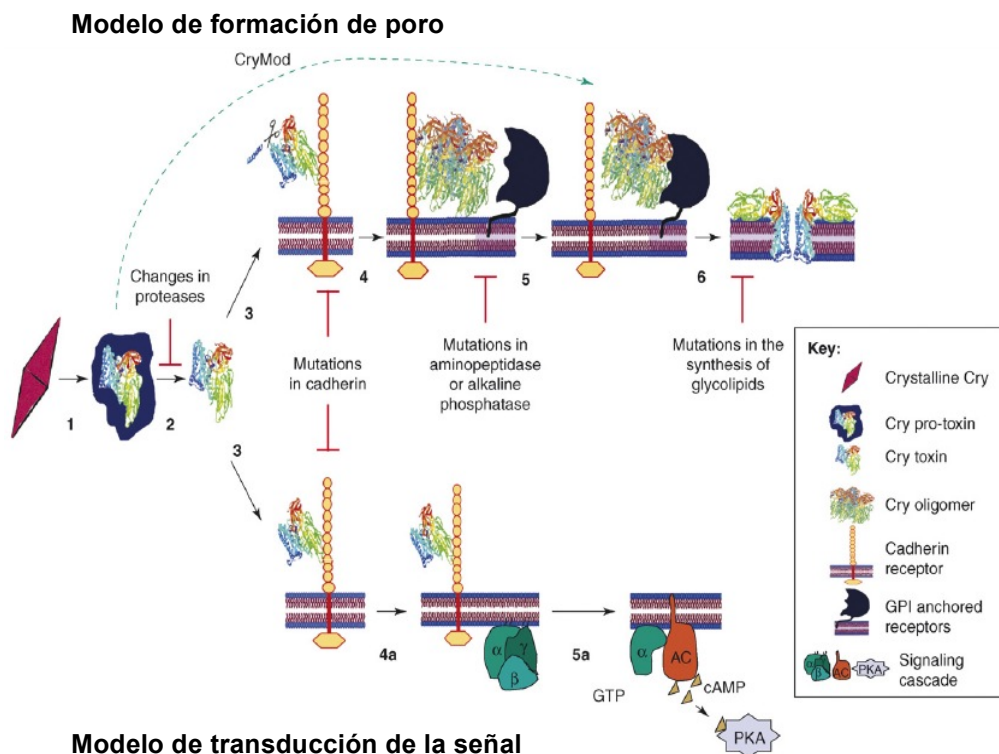


Figura 3. Esquema de los modelos de acción propuestos de las toxinas Cry. Ambos modelos comparten los primeros pasos como la solubilización (1), la activación por proteasas (2), y la unión a la cadherina como receptor primario (3), las diferencias se encuentran en los pasos siguientes. El modelo de formación de poro (arriba) continúa con la eliminación de la hélice α -1 cuando se une a la cadherina (3), oligomerización (4), unión del oligómero a un receptor secundario (5), y por último inserción del oligómero en la membrana y formación del poro (6). El modelo de transducción de la señal (abajo) propone que tras la unión de la proteína Cry a la cadherina se produce una señal intracelular que activa a la proteína G (4a), y posteriormente se activa la adenil ciclasa (5a), esto conlleva un incremento del AMP cíclico que activa la proteína quinasa A provocando la muerte celular. (Bravo, *et al.*, 2008).

El modelo de la unión secuencial a dos tipos de receptores fue propuesto por Bravo (Bravo, *et al.*, 2004) y se basa en estudios llevados a cabo con la proteína Cry1Ab utilizando vesículas de membrana de intestino de *M. sexta*. Según este modelo, el receptor primario (cadherina) es al que se une la toxina, éste facilita el procesamiento de la toxina y la formación del oligómero (Gomez, *et al.*, 2002, Rausell, *et al.*, 2004). A continuación, el oligómero se une a un segundo receptor, que puede ser tanto la APN como la ALP (Bravo, *et al.*, 2007, Jurat-Fuentes, *et al.*, 2004), que son proteínas ancladas a la membrana mediante el grupo glicosilfosfatidil inositol. Una vez unidos, el oligómero se inserta en la membrana formando poros en ésta, lo que causa la lisis y la muerte celular, que como última causa tiene la muerte del insecto (Bravo, *et al.*, 2007, Bravo, *et al.*, 2008, Jimenez-Juarez, *et al.*, 2008). Trabajos en

mosquitos y coleópteros sugieren que este modelo secuencial también podría tener lugar en dípteros y coleópteros (Fernandez, *et al.*, 2006, Hua, *et al.*, 2008, Ochoa-Campuzano, *et al.*, 2007, Perez, *et al.*, 2007, Rausell, *et al.*, 2004). Más recientemente se ha propuesto un cambio al modelo secuencial, dando paso al modelo de unión “ping-pong” (Pacheco, *et al.*, 2009) y, según el cual, la toxina se uniría en primer lugar a APN o ALP, las cuales son muy abundantes, concentrando así gran cantidad de interacciones débiles entre toxinas y receptores (Figura 4). Esta situación favorecería la interacción de alta afinidad de la toxina a la cadherina y los pasos posteriores ya comentados.

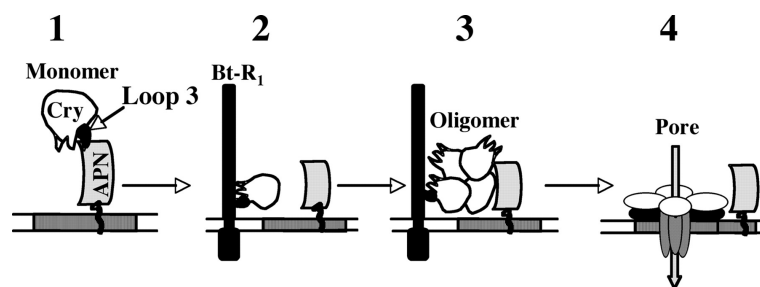


Figura 4. Modelo de unión ping-pong. 1) unión del monómero a APN, 2) unión del monómero a la cadherina, 3) formación del oligómero mediante la unión a la cadherina y a la APN, 4) inserción del oligómero en la membrana y formación del poro. (Pacheco, *et al.*, 2009)

El segundo modelo fue propuesto por Zhang (Zhang, *et al.*, 2006) y sugiere que la unión de la toxina al receptor primario (cadherina) en forma de monómero es suficiente para producir toxicidad, ya que tras la unión se activaría la proteína G y una adenilato ciclasa, aumentando la cantidad de AMP cíclico que activaría una proteína quinasa A lo cual conlleva la muerte celular. Este modelo ha sido ampliado añadiendo la exocitosis de receptores Bt-R1 hacia la membrana aumentando así su número en ésta (Zhang, *et al.*, 2008).

Se han descrito otros factores de virulencia en *B. thuringiensis* como son la β -exotoxina, las enterotoxinas, las hemolisinas y las exoenzimas. La β -exotoxina también es conocida como thuringiensina o exotoxina termoestable, y se secreta durante la fase de crecimiento vegetativo. Esta toxina es un análogo estructural de los nucleótidos de Adenina por lo que actúa inhibiendo las RNA polimerasas dependientes de DNA (Sebesta, *et al.*, 1970), por esta razón tiene un amplio espectro afectando tanto a invertebrados como a vertebrados. La β -exotoxina se ha encontrado sólo en aislados de invertebrados muertos (Espinasse, *et al.*, 2003) y se ha detectado en diferentes serovares de *B. thuringiensis*. Las enterotoxinas también se han encontrado en *B. cereus* y se han visto implicadas en procesos de diarrea (Damgaard, 1995, Damgaard, *et al.*, 1996, Gavia Rivera, *et al.*, 2000, Yuan, *et al.*, 2002). Las

hemolisinas se han encontrado en algunos aislados de *B. thuringiensis* (Honda, *et al.*, 1991, Matsuyama, *et al.*, 1995) y tienen un efecto tóxico para eritrocitos de vertebrados. Las exoenzimas son enzimas hidrolíticas como las fosfolipasas, capaces de hidrolizar los fosfolípidos de la membrana facilitando así la infección (Hansen y Salamiou, 2000). Dentro de este grupo también se encuentran las proteasas y las quitinasas que actúan disgregando la membrana peritrófica lo que facilita el paso de las toxinas y las bacterias (Barboza-Corona, *et al.*, 2007).

En último lugar, y dependiendo del daño celular producido, en las larvas se pueden observar diferentes efectos tóxicos. Si la cantidad de células dañadas es reducida, éstas podrían ser remplazadas sin causas letales para la larva. En cambio, si el daño producido afecta a un número elevado de células, siendo generalizado y observándose la destrucción de regiones del epitelio, los contenidos del intestino y la hemolinfa se mezclan, ya que no existe la barrera física que los separaba, lo que conlleva efectos graves en la salud de la larva (Gill, *et al.*, 1992). Esta mezcla de contenidos tan diferentes conlleva un aumento de pH en la hemolinfa y una disminución del pH del contenido intestinal. Al aumentar el pH en hemolinfa la conducción nerviosa cesa y la larva se paraliza, por lo que deja de comer. La larva puede acabar muriendo de inanición. La disminución del pH del contenido intestinal favorece la germinación de las esporas, proliferando así las bacterias en el individuo que podrían acabar produciendo una septicemia en él (Glare y O'Callaghan, 2000). En otros trabajos, como los de Broderick (Broderick, *et al.*, 2006, Broderick, *et al.*, 2009), se afirma que *B. thuringiensis* no es capaz de matar en ausencia de microbiota en el intestino de la larva y que esta bacteria muere en la hemolinfa, por lo que la acción letal se debe a la microbiota.

Existen otras especies de bacterias entomopatógenas que afectan a invertebrados. Una de ellas, *Bacillus bombysepticus* es una bacteria que fue aislada a partir de cadáveres de *B. mori* por Hartman en 1931. Es una bacteria gram-positiva productora de esporas y cristales, afecta de forma natural a *B. mori* y puede provocar una septicemia aguda matando a la larva en un día. Otra bacteria entomopatógena es *Xenorhabdus nematophila*, que es capaz de inhibir la síntesis de eicosanoides (Park, *et al.*, 2000) y así reducir la fagocitosis y la formación de nódulos en la hemolinfa (Lavine y Strand, 2002). Es una bacteria simbiote del nematodo *Steinernema carpocapsae* (Akhurst, 1980), habita en el intestino de éste hasta que después de la infección es liberado en el hemocele y juega un papel importante en la patogenicidad del complejo bacteria-nematodo produciendo inmunosupresión en el huésped (Kaya y Gaugler, 1993). Otro ejemplo de bacteria entomopatógena es *Pseudomonas entomophila*, una bacteria gram-negativa que se puede encontrar en suelo, agua y

superficies de las plantas. Esta bacteria resulta altamente patogénica en *Drosophila melanogaster*, tanto en larvas como adultos, y lleva a la destrucción de las células del intestino (Vodovar, *et al.*, 2005), matando rápidamente, entre las 24 y 48 horas siguientes a la infección. También es patogénica a otros insectos: *Anopheles gambiae* (díptero), *B. mori* y *Galleria mellonella* (lepidópteros) (Fedhila, *et al.*, 2010). Otro ejemplo de bacteria que también afecta a *Drosophila* es *Erwinia carotovora 15* (*Ecc15*), la cual cuando es ingerida es capaz de persistir en el intestino sin producir letalidad pero sí induciendo la respuesta inmune (Basset, *et al.*, 2000).

1.1.2 Virus entomopatógenos

Los virus son agentes infecciosos microscópicos los cuáles necesitan de células huésped para poder replicarse y completar su ciclo. Las infecciones víricas están entre las enfermedades de invertebrados más ampliamente estudiadas. En la actualidad se han identificado más de 200 especies de virus de invertebrados (Comité Internacional de Taxonomía de Virus, ICTV, www.ictvonline.org) y existe una elevada variabilidad en cuanto al tipo de virus. Principalmente tres familias son las más importantes: Baculoviridae, Poxviridae y Reoviridae. Estos dos últimos también afectan a vertebrados, en cambio los baculovirus son exclusivos de artrópodos. Otras familias de virus entomopatógenos también son Ascoviridae, Iridoviridae, Nonaviridae, Parvoviridae, Picornaviridae, Polydnviridae y Tetraviridae.

Entre los virus entomopatógenos cabe destacar como la más importante la familia Baculoviridae, ya que actualmente estos virus son ampliamente utilizados en diversas aplicaciones biotecnológicas. Los baculovirus son virus de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena circular y su genoma suele tener entre 80 y 180 kilobases, en las cuales suele haber unas 100 pautas de lectura abierta (ORF) aproximadamente (Rohrmann, 2008). La información genética de los baculovirus se encuentra envuelta por una matriz proteica con forma de varilla llamada nucleocápsida. Cuando estas nucleocápsidas adquieren una membrana o envuelta se las conoce como viriones que pueden ser de dos fenotipos diferentes: los viriones brotantes (BV: budded virus) y los viriones derivados de los cuerpos de inclusión (ODV: occlusion derived virus). Estos dos fenotipos difieren tanto en su estructura como en su composición de lípidos, ácidos grasos y proteínas de su membrana (Braunagel, *et al.*, 1994), lo que afecta a su capacidad infectiva. Mientras que los ODV son principalmente infectivos para las células columnares del intestino, los BV son capaces de infectar prácticamente al resto de tipos celulares (Blissard, 1996). Los BVs se forman como consecuencia de la salida de la nucleocápsida a través de la membrana de la célula en la que ha sido sintetizada

y contienen en su interior una única nucleocápsida. En cambio, los ODVs se originan cuando las nucleocápsidas permanecen en la célula que han sido sintetizadas y adquieren una membrana sintetizada de *novo* (Stolz, *et al.*, 1973), pudiendo envolver una (ODV simple) o más nucleocápsidas (ODV múltiple). Al final del proceso de infección los ODVs se incluyen dentro de grandes cantidades de una proteína (poliedrina o granulina) en lo que se conoce como cuerpo de inclusión (OB occlusion body).

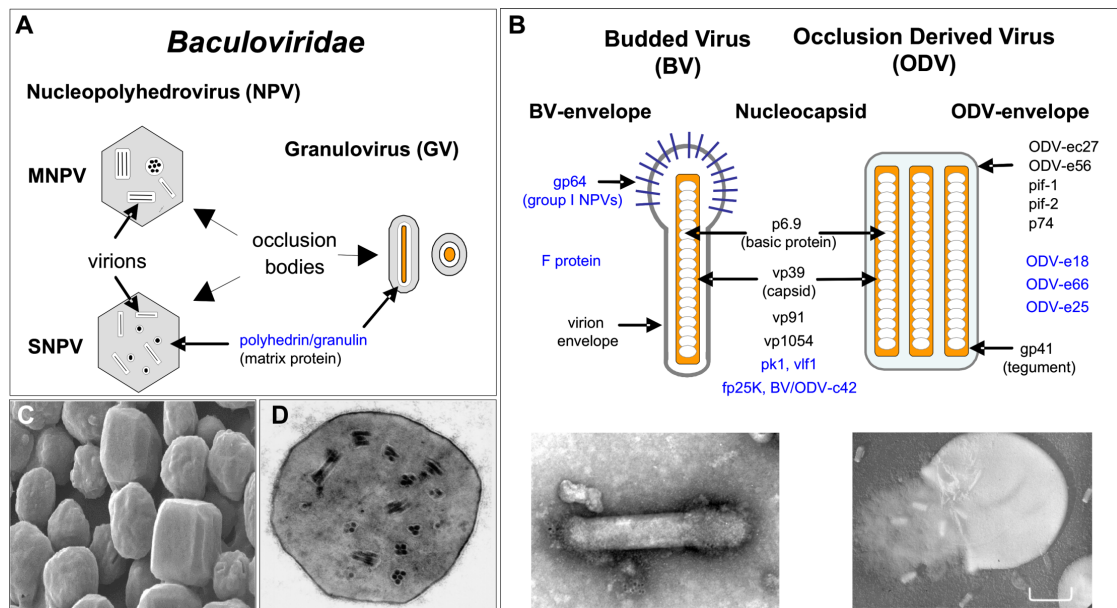


Figura 5. (A) Clasificación tradicional de los baculovirus según la morfología de su cuerpo de inclusión. (B) Diferentes fenotipos de los baculovirus: viriones brotantes (BV) y viriones derivados de cuerpos de inclusión (ODV). (C) Microfotografía de cuerpos de inclusión (OBs) y (D) ODVs dentro de un OB (van Oers, *et al.*, 2007).

Tradicionalmente, los baculovirus se clasificaban en función de la morfología de estos cuerpos de inclusión (Figura 5), dando lugar a dos géneros: *Granulovirus* (GV) y *Nucleopoliedrovirus* (NPV). Los granulovirus presentan unos cuerpos de inclusión de forma ovo-cilíndrica y su tamaño es más reducido (0.3-0.5 μm), además de que presentan solamente un único virión en cada OB. Los nucleopoliedrovirus muestran un espectro de huéspedes más restringido que los nucleopoliedrovirus, ya que normalmente se reduce a un pequeño número de especies. En cambio, los nucleopoliedrovirus producen OBs de forma poliédrica cuyo tamaño es mayor (0.5-15 μm), y cada OB normalmente contiene varios viriones. Dentro de los nucleopoliedrovirus se pueden distinguir dos grupos: aquellos que encapsidan varios viriones juntos son los nucleopoliedrovirus múltiples (MNPV), y los que encapsidan un único virión, que se les denomina nucleopoliedrovirus simples (SNPV).

Recientemente, algunos autores han propuesto una nueva clasificación de

baculovirus basándose en el análisis de secuencias de ciertos genes conservados. En esta nueva clasificación se observa una evidente distinción en cuanto al orden del insecto huésped al que infectan, por lo que constaría de cuatro géneros (Figura 6): *Alphabaculovirus* (nucleopoliedrovirus que infectan lepidópteros), *Betabaculovirus* (granulovirus que infectan lepidópteros), *Gammabaculovirus* (nucleopoliedrovirus de himenópteros) y *Deltabaculovirus* (nucleopoliedrovirus de dípteros) (Jehle, et al., 2006)

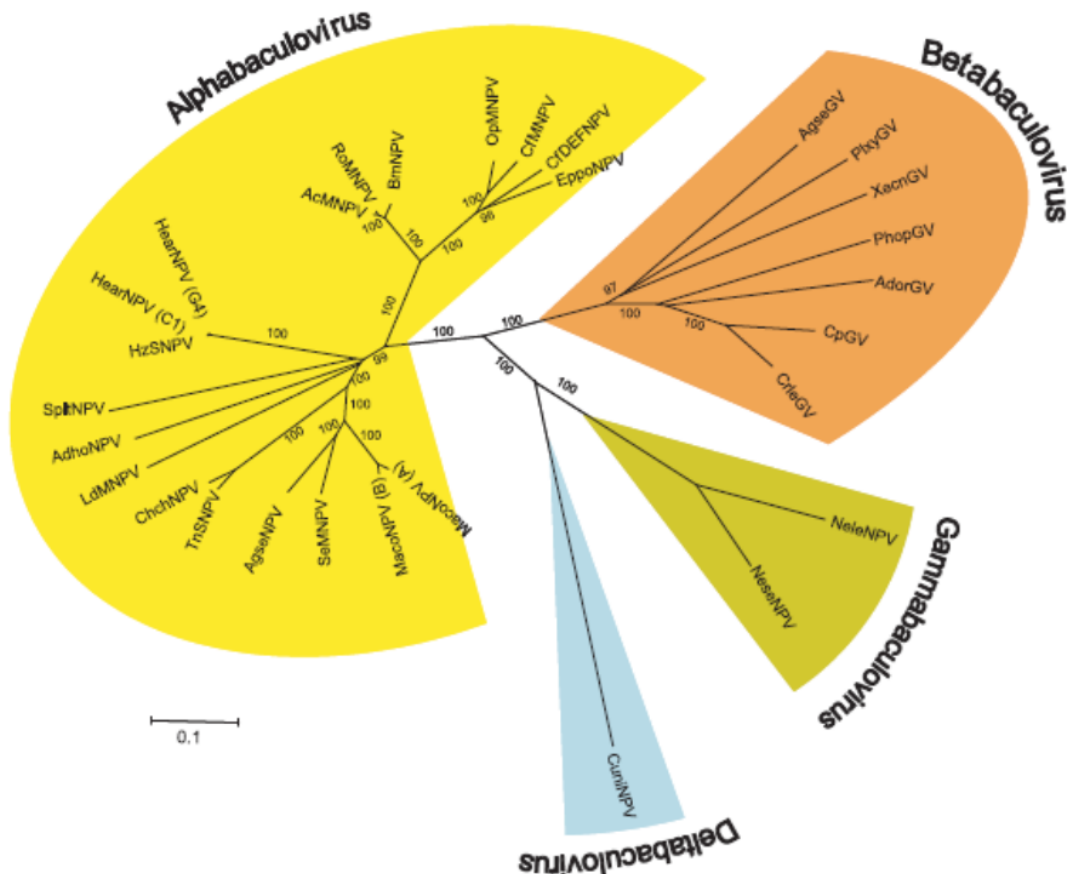


Figura 6. Árbol filogenético obtenido a partir de 29 baculovirus distintos. Se observa que cada una de las ramas principales corresponde a uno de los 4 géneros propuestos. (Jehle, et al., 2006).

Al igual que ocurre en la infección con bacterias entomopatógenas, la infección vírica comienza tras la ingestión de los cuerpos de inclusión por parte de la larva (Figura 7). En el intestino, debido al pH alcalino y a las proteasas intestinales, los cuerpos de inclusión se disuelven liberando los ODVs al lumen e infectan a las células del intestino medio. Estos viriones se unen a la membrana celular y liberan las nucleocápsidas al interior de la célula. Los primeros ciclos de replicación resultan en la producción de viriones brotantes (BV), que salen por la membrana y se dispersan por todo el insecto a través de la hemolinfa comenzando así la infección secundaria en el resto de tejidos. En los últimos pasos del proceso infectivo, las nucleocápsidas se ocuyen, individualmente o en grupos, en cuerpos de inclusión, los cuales se replican

en el insecto y serán dispersados con su muerte. Estos cadáveres infectados servirán como fuente de virus para las siguientes infecciones que comenzarán con su ingestión por parte de la larva.

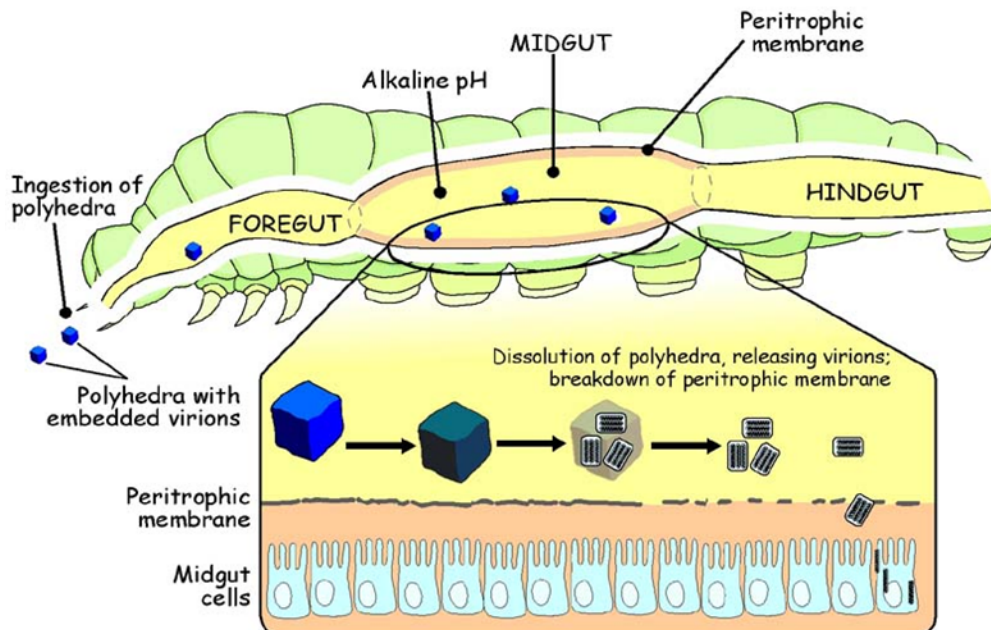


Figura 7. Representación de la infección por baculovirus en larvas. La infección comienza con la ingestión de los cuerpos de inclusión que se disuelven en el intestino medio liberando los viriones. Éstos atraviesan la membrana peritrofica hasta alcanzar las células epiteliales del intestino, donde liberan las nucleocápsidas que inician la infección celular.

(<http://www.microbiologybytes.com/virology/kalmakoff/baculo/baculo.html>).

Los síntomas producidos por infección de baculovirus se manifiestan cuando la enfermedad está ya avanzada. Los síntomas más evidentes son la mayor flacidez de los cuerpos de las larvas, retraso en el desarrollo, una mayor movilidad y, en el caso de lepidópteros, las larvas de éstos tienden a emigrar a las partes altas de las plantas donde mueren colgados. Posteriormente a la muerte, los tejidos de la larva se desintegran y se libera gran cantidad de virus al medio, que serán ingeridos por otras larvas comenzando así de nuevo el ciclo del baculovirus (Caballero, 2001).

1.1.3 Hongos entomopatógenos

Los hongos son un grupo de organismos eucariotas que forman un reino diferente al de los animales, las plantas y las bacterias. Existen más de 700 especies de hongos entomopatógenos (Roberts y Humbert, 1981), sin embargo el número de especies estudiadas para el control de plagas es muy restringido debido a la dificultad de producirlos de forma estable y masiva.

Los hongos se transmiten mediante esporas o conidias, bien por el aire o a través de animales enfermos. El ciclo comienza con la germinación de la espora sobre el

tegumento. Aunque no es frecuente, las esporas también pueden ser ingeridas por el insecto (que es la vía principal en infecciones producidas por virus y bacterias). Para producir la infestación, los hongos deben atravesar la cutícula del insecto hasta llegar al hemocele, el cual colonizan, lo que permite su distribución y crecimiento por todos los órganos del insecto huésped (Desphande, 1999). Su desarrollo es muy dependiente de las condiciones ambientales (alta humedad relativa, temperatura cálida) y de la densidad del huésped. Muchos hongos entomopatógenos vencen al huésped sólo después de su crecimiento en el hemocele y sus toxinas se consideran las responsables de la muerte del huésped. Estas toxinas provocan alteraciones en varios orgánulos, paralizan las células o causan un mal funcionamiento de varios tejidos como el intestino, el tejido muscular, los hemocitos, etc. En condiciones favorables para el hongo se producen estructuras que salen del cadáver del huésped y se produce la fructificación, siendo el foco principal de infección para un nuevo huésped (Desphande, 1999). Como ejemplos de hongos entomopatógenos podemos encontrar *B. bassiana*, *Metarrhizium anisopliae* y *Verticillium lecanii*.

1.1.4 Nematodos entomopatógenos

Los nematodos son también conocidos como gusanos redondos, y cada vez es mayor su importancia como agentes de control biológico. El hábitat principal de los nematodos es el suelo y el cuerpo de su huésped. Infectan muchos tipos diferentes de insectos del suelo, incluyendo estadios larvarios de mariposas, polillas, escarabajos y moscas, así como grillos y saltamontes adultos. Los géneros más estudiados son aquellos que resultan útiles en el control biológico de plagas de insectos: *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* (Gaugler, 2006).

Los nematodos, en su ciclo vital, normalmente presentan cuatro mudas o estadios juveniles desde huevo a adulto. Los terceros estadios juveniles son las formas infectivas de vida libre (Figura 8). Estas formas pueden penetrar por la cutícula o por el tubo digestivo y así llegar al hemocele donde comienzan un periodo de rápido crecimiento, pudiendo salir del huésped al suelo para alcanzar el estado adulto o bien desarrollar dos o más generaciones dentro del huésped, según disponibilidades (García del Pino y Morton, 2008). Dentro del huésped, el nematodo libera la bacteria simbiote que transporta en su intestino. Estas bacterias simbióticas pertenecen a dos géneros: *Xenorhabdus spp.* y *Photorhabdus spp.*, simbiotes de *Steinernema* y *Heterorhabditis*, respectivamente. Son enterobacterias gram-negativas que no se encuentran libres en la naturaleza. Es en realidad la bacteria la que causa la muerte del insecto por septicemia debido a la liberación de toxinas dentro de su cuerpo. La

bacteria disgrega así los tejidos del insecto proporcionando alimento a los nematodos (Malais y Ravensberg, 2003).

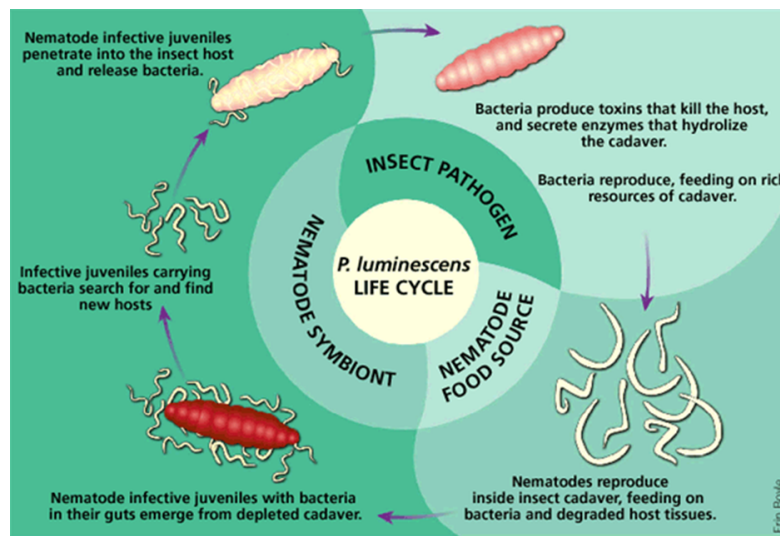


Figura 8. Esquema del ciclo biológico de un nematodo entomopatógeno y la bacteria simbiote (Williamson, *et al.*, 2003).

1.1.5 Protozoos entomopatógenos

Los protozoos son organismos eucariotas unicelulares y cuyos ciclos de vida pueden llegar a ser muy complejos. No se emplean mucho en el control de insectos debido a la falta de especificidad por parte de la mayoría de las especies de protozoos. El protozoo más comercializado es *Nosema locustae*, que afecta a ortópteros (langostas).

Los estados infectivos del protozoo (esporas, quistes, etc) penetran en el tubo digestivo del insecto, y lo colonizan hasta llegar al aparato excretor. Cuando la espora penetra en el tubo digestivo, germina gracias al pH ácido del estómago, se forma el protozoo y produce nuevas esporas. Los insectos mueren por falta de asimilación de los elementos nutritivos. Los síntomas característicos de los individuos enfermos se resumen en la aparición de deformaciones y dificultades en la muda, junto a una baja actividad de alimentación.

1.2 Interacción insecto-patógeno

El resultado de una infección depende de la interacción entre el huésped y el patógeno, siendo este tipo de interacción muy compleja y dinámica. El huésped desarrolla estrategias para minimizar los efectos patogénicos y su muerte mientras que el patógeno desarrolla estrategias que aumenten sus probabilidades de éxito en la

infección. Los invertebrados más usados como animales modelo para el estudio de esta interacción son *Caenorhabditis elegans* y *D. melanogaster*.

Tanto los insectos como los mamíferos poseen una inmunidad innata, la cual hace referencia a la primera línea de defensa que sirve para limitar la infección durante las primeras horas de exposición a los microorganismos (Hoffmann, *et al.*, 1999). La principal diferencia que existe entre el sistema inmune de insectos y mamíferos reside en que éstos últimos poseen un sistema inmune con memoria, lo que se conoce también como inmunidad adquirida (Beckage, 2008). A pesar de esta carencia, los insectos son capaces de inducir su respuesta inmune después de exposiciones sub-letales a sustancias dañinas e incluso transmitir cierta inducción a la descendencia. Por ejemplo, se ha visto que exposiciones sub-letales a *B. thuringiensis* produce un efecto protector llevando así a la aparición de tolerancia (Rahman, *et al.*, 2004). Se ha observado que el estado de inmunización puede ser transmitido a la descendencia (Kurtz, *et al.*, 2003, Little, *et al.*, 2004, Sadd, *et al.*, 2006), así como un aumento consecutivo del estado de inmunización en generaciones subsiguientes (Freitak, *et al.*, 2009, Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010, Rahman, *et al.*, 2004). Pero esta inducción del sistema inmune se ha visto asociada a un coste biológico como consecuencia (Kraaijeveld, *et al.*, 1997, Moret, *et al.*, 2000). A pesar de carecer de memoria, el sistema inmune de insectos sí que posee la habilidad de distinguir entre diferentes clases de patógenos (Hoffmann, 2003, Lemaitre, *et al.*, 2007).

En el sistema inmune también se pueden diferenciar dos tipos de respuesta: la respuesta sistémica y la respuesta local. La respuesta inmune sistémica comprende los procesos de melanización, fagocitosis, encapsulación y la secreción de péptidos antimicrobianos a la hemolinfa por parte del cuerpo graso, lo cual hace que esta respuesta tenga lugar por todo el cuerpo del insecto. En cambio la respuesta inmune local hace referencia a la respuesta concreta y localizada que lleva a cabo un tejido u órgano del insecto para luchar contra la infección; por ejemplo, el intestino actuaría produciendo especies reactivas de oxígeno, produciendo péptidos antimicrobianos y mediante la barrera física que es la membrana peritrófica (Lemaitre, *et al.*, 2007). Además también se puede diferenciar entre respuesta inmune humoral y respuesta inmune celular. La respuesta humoral hace referencia a varias moléculas efectoras que son solubles mientras que la respuesta celular hace referencia a aquellos procesos que son llevados a cabo por las células, especialmente por hemocitos (Beckage, 2008).

En la respuesta a patógenos podríamos distinguir tres tipos de elementos según su función general: un grupo de elementos encargados de reconocer los patógenos

(elementos sensores), otro grupo de elementos pertenecientes a las rutas de señalización, y otro tipo de elementos que, una vez identificada la presencia de los patógenos, intentan destruirlos (componentes efectores).

1.2.1 Elementos sensores de patógenos

Los elementos sensores son los encargados del proceso de reconocimiento mediante interacciones con los patógenos. Estos elementos también deben de ser capaces de distinguir entre los diferentes tipos de patógenos así como la microbiota comensal del intestino de los insectos. Mayoritariamente, se habla de dos tipos de elementos sensores: las estructuras moleculares asociadas a patógenos (Pathogen Associated Molecular Structures, PAMS) y las partículas lipídicas. Las PAMS modulan el proceso de reconocimiento mediante interacciones específicas de proteínas con estructuras moleculares que indiquen un agente extraño. En el caso de las partículas lipídicas se han descrito diferentes funciones en los insectos, tanto como transportadores de lípidos (Canavoso, *et al.*, 2001, Rodenburg, *et al.*, 2005), como partículas sensoras en el reconocimiento de lipopolisacáridos (Kato, *et al.*, 2004), toxinas (Vilcinskas *et al.*, 1997) y en la producción de oxígeno reactivo (Arakawa *et al.*, 1996), por lo que juegan papeles importantes en la respuesta inmune de insectos (Cheon, *et al.*, 2006).

El sistema inmune de los insectos es capaz de reconocer distintos tipos de patógenos para poder activar las respuestas necesarias con el fin de minimizar los efectos patogénicos que pueda producir éstos. Este reconocimiento diferencial se produce a nivel de las moléculas sensoras, que son capaces de distinguir en primer lugar el tipo de patógeno y en segundo lugar activar las diferentes respuestas. En cuanto a las bacterias, los mecanismos sensores son capaces de distinguir entre bacterias gram-positivas y bacterias gram-negativas. La pared celular de las bacterias está formada por peptidoglucanos (PGN), que son glucopéptidos formados por cadenas alternas de ácido *N*-acetilmuránico y *N*-acetilglucosamina unidas por enlaces peptídicos (Mengin-Lecreulx, *et al.*, 2005). Estas moléculas de PGN son diferentes de unas bacterias a otras, encontrando la mayor diferencia entre bacterias gram-positivas y gram-negativas (Figura 9). En las bacterias gram-positivas estos PGN están formando varias capas y se encuentran expuestos en la superficie de la bacteria; además, tienen residuos de lisina (PGN tipo lisina). En cambio, en las bacterias gram-negativas la pared celular posee una única capa, donde la localización de los peptidoglucanos está en el espacio periplásmico entre la membrana externa y la capa de polisacáridos, siendo estos PGNs de tipo DAP (se ha sustituido la lisina por ácido

meso-diapimérico). Las moléculas que reconocen estas formas específicas de PGN son las **proteínas de reconocimiento de peptidoglicanos** o **PGRPs** y éstas activan las diferentes rutas o cascadas de señalización que inducen la producción de péptidos antimicrobianos, la fagocitosis y la hidrólisis de PGNs, entre otros mecanismos de respuesta. Existen tanto PGRPs de reconocimiento de bacterias gram-negativas como de bacterias gram-positivas. Otro tipo de moléculas de reconocimiento son las **proteínas de unión a bacterias Gram-negativas** o **GNBP** cuyo nombre induce a error ya que también reconocen bacterias gram-positivas y hongos. La primera GNBP que se aisló fue en el lepidóptero *B. mori* y se describió como una proteína que podía unirse a la pared celular de bacterias gram-negativas (Lee, *et al.*, 1996) y esta unión inducía la respuesta vía la ruta de señalización Toll (Kim, *et al.*, 2000, Pili-Floury, *et al.*, 2004). Se ha descrito, en *D. melanogaster*, que GNBP1 une a bacterias gram-positivas y GNBP3 a hongos. Esta última proteína tiene una elevada similitud con las proteínas de reconocimiento de β -1,3-glucano en lepidópteros (Ochiai y Ashida, 1988).

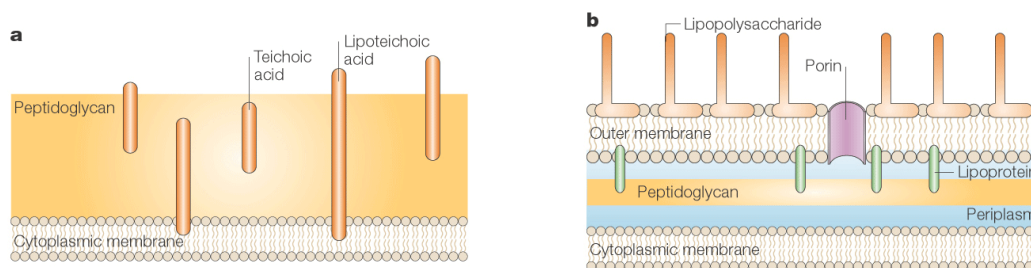


Figura 9. Esquema de la pared celular en bacterias (a) Pared celular de bacterias gram-positivas. (b) Pared celular de bacterias gram-negativas. (Cabeen y Jacobs-Wagner, 2005).

Otro grupo de moléculas sensoras descritas son las **inmunolectinas**, que son lectinas dependientes de calcio que contienen un dominio receptor de carbohidratos. Se han identificado en diferentes especies de insectos como *M. sexta* (Yu, *et al.*, 1999), *B. mori* (Ohta, *et al.*, 2006), *D. melanogaster* y *A. gambiae* (Koizumi, *et al.*, 1999, Shin, *et al.*, 1998). Las inmunolectinas se unen a lipopolisacáridos, a ácido lipoteicoico y al β -1,3-glucano fúngico (Yu, *et al.*, 2000). Están implicadas tanto en la respuesta humoral como en la celular (activación de la profenol oxidasa o proPO, fagocitosis, formación de nódulos, encapsulación y melanización) (Koizumi, *et al.*, 1999, Yu, *et al.*, 2004)

Las **proteínas que contienen thioéster** o **TEPs** también son otro grupo de moléculas capaces de reconocer patógenos, y además inducen la fagocitosis de éste, la actividad proteolítica del insecto para la destrucción del patógeno y la activación de la ruta JAK/STAT (Agaisse, y Perrimon, 2004). Diferentes proteínas TEP son

responsables del marcaje de diferentes microbios para su ingestión y destrucción por parte de los hemocitos, proceso que se conoce como opsonización. En este grupo se incluyen las α_2 -macroglobulinas y factores complementarios en vertebrados. La α_2 -macroglobulina se une a proteasas secretadas y media su internalización así como su inactivación por las células del huésped. En *D. melanogaster* existen seis proteínas TEP y se ha observado la inducción de 3 de ellas en hemocitos y cuerpo graso después de la infección con *Escherichia coli* y *Micrococcus luteus* (Lagueux, *et al.*, 2000).

La **Hemolina** es una proteína sensora del tipo inmunoglobulina que se encuentra en la hemolinfa de lepidópteros (Kanost, *et al.*, 2004). Parece ser exclusiva de lepidópteros ya que no se han encontrado homólogos ni en *D. melanogaster* ni en *A. gambiae*. Tanto su transcripción como su traducción se encuentran altamente inducidas después de la infección (Wang, *et al.*, 1995, Ladendorff y Kanost, M.R., 1991) así como en respuesta a infecciones víricas (Terenius, 2008). En *M. sexta* se ha observado que es capaz de unirse a bacterias induciendo su fagocitosis por hemocitos (Eleftherianos, *et al.*, 2007). Además, la Hemolina se ha encontrado en grandes cantidades en el intestino de larvas de *Lymantria dispar* durante la diapausa (Lee, *et al.*, 2002).

1.2.2 Regulación de la respuesta: las rutas de señalización

Tras el primer paso de detección de los patógenos, se activan diferentes vías de señalización que desencadenarán las respuestas de defensa del insecto. Se han descrito principalmente tres rutas que modulan la respuesta inmune en insectos: la ruta Toll, la ruta de la inmunodeficiencia (IMD) y la ruta JAK/STAT (Janus Kinases/Signal Transducers and Activators of Transcription). No obstante, existen más rutas que también pueden participar tanto en la activación como en la regulación de la respuesta inmune de insectos (Lemaitre, *et al.*, 2007) (Figura 10).

La **ruta Toll** responde básicamente a la infección producida por bacterias gram-positivas y hongos. Esta ruta se encuentra muy conservada evolutivamente y juega un papel clave en el establecimiento del eje dorso-ventral en embriones de *D. melanogaster*, así como en varios procesos de desarrollo (Belvin, *et al.*, 1996). Los componentes principales de esta vía son: Spätzle (una citoquina extracelular que comparte similitudes con el factor de crecimiento neuronal), el receptor transmembrana Toll, los adaptadores Tube y MyD88, la quinasa Pelle, Cactus (el homólogo de I κ B en *D. melanogaster*) y los transactivadores Dorsal y Dif (Belvin, *et al.*, 1996, Tauszig-Delamasure, *et al.*, 2002) (Figura 10). La supresión de cualquiera de

estos componentes, a excepción de Cactus y Dorsal, causa un fenotipo de inmunodeficiencia que se caracteriza por la falta de expresión de genes de respuesta inmune y una elevada susceptibilidad a hongos y bacterias gram-positivas (Lemaitre, *et al.*, 1996, Rutschmann, *et al.*, 2000). También se han observado varios componentes de la ruta Toll sobreexpresados en intestinos de larvas de *B. mori* expuestas a diferentes patógenos mediante inyección (Cheng, *et al.*, 2008).

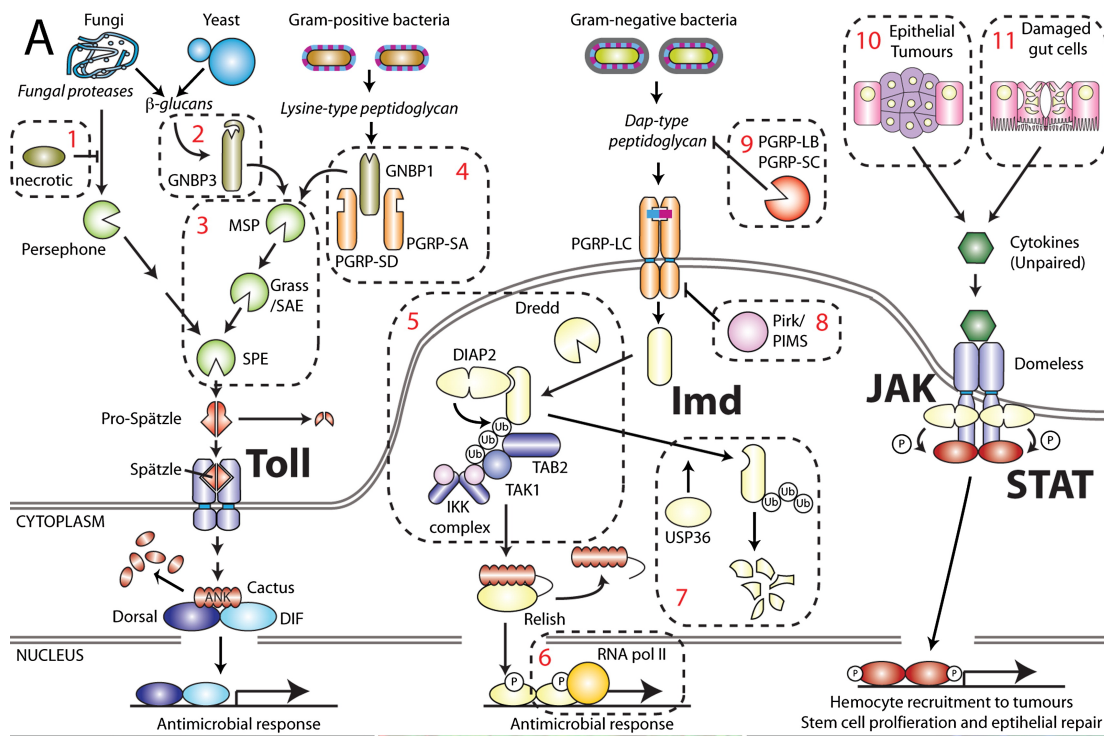


Figura 10. Principales rutas de señalización de la respuesta inmune en *D. melanogaster* (Welchman, *et al.*, 2009).

La ruta *Imd* responde básicamente a la infección de bacterias gram-negativas y a algunas gram-positivas, como las del género *Bacillus* (con peptidoglucanos tipo DAP). Se identificó por primera vez en *D. melanogaster* al estudiar una mutación que reducía la expresión de péptidos antimicrobianos y se observó que las moscas con esta mutación eran más susceptibles a las bacterias gram-negativas pero más resistentes a las infecciones por hongos y bacterias gram-positivas que las mutantes de *Toll*. En esta ruta se han identificado 8 componentes principales en *D. melanogaster*: el receptor PGRP-LC (Choe, *et al.*, 2002, Gottar, *et al.*, 2002, Ramet, *et al.*, 2002); la proteína quinasa activada por mitógeno 3 (Mitogen-Activated Protein 3 Kinase, MAP3K), TAK1 (Vidal, *et al.*, 2001), TAB2 (Kleino, *et al.*, 2005), DIAP2 (miembro de las proteínas inhibidoras de apoptosis) (Kleino, *et al.*, 2005), IKK β /ird5 y IKK γ /Kenny (Rutschmann, *et al.*, 2000, Silverman, *et al.*, 2000), el adaptador dFADD (Leulier, *et al.*, 2002), la caspasa Dredd (Leulier, *et al.*, 2000) y el factor de

transcripción Relish (Khush, *et al.*, 2002) (Figura 10). Las mutaciones en estos miembros de la ruta producen un síndrome de deficiencia inmunológica similar en caso de infección, pero los mutantes son perfectamente viables en ausencia de infección. En lepidópteros se ha observado que la inyección de *E. coli* (bacteria gram-negativa) induce esta ruta aumentando la expresión de *relish* y del AMP *cecropina B1* en el cuerpo gordo, aunque no lo hace cuando se infecta con *S. aureus* (bacteria gram-positiva) (Tanaka, *et al.*, 2007). El mutante de *B. mori* con deficiencia de *relish* falla en la activación de la síntesis de péptidos antimicrobianos (AMPs), como ocurre en *D. melanogaster*.

La **ruta JAK/STAT** se ha visto implicada en la respuesta a bacterias gram-negativas (Buchon, *et al.*, 2009) y a virus en *D. melanogaster*. Los mutantes de esta ruta se muestran más sensibles a infecciones víricas como la del virus C de *D. melanogaster* (Dostert, *et al.*, 2005), no obstante, estos mutantes muestran un perfil de síntesis de AMPs normal. Se ha propuesto que esta ruta podría actuar respondiendo al daño celular producido en la infección (Buchon, *et al.*, 2009, Cronin, *et al.*, 2009, Jiang, *et al.*, 2009, Jiang, *et al.*, 2009) activando tanto la proliferación de células precursoras (donde sinergiza con la ruta EGFR) como la diferenciación en los enterocitos (Buchon, *et al.*, 2010). Además, se ha observado la implicación de esta ruta en el control de la carga vírica durante la infección, aunque la activación de esta ruta exclusivamente no es suficiente para superar la infección (Dostert, *et al.*, 2005). Los tres componentes principales de esta ruta son: Domeless (el receptor), la quinasa Janus (JAK) y el factor de transcripción STAT (Agaisse, *et al.*, 2004) (Figura 10). La primera vez que se observó su implicación en el sistema inmune fue en *A. gambiae* al observarse la acumulación de STAT en el núcleo (Barillas-Mury, *et al.*, 1999).

La **ruta EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)** es una de las principales rutas de regulación de la remodelación durante el desarrollo en un amplio rango de organismos multicelular (Schweitzer, *et al.*, 1997). Recientemente, en células madre de *D. melanogaster*, se ha observado la implicación de la ruta EGFR en la proliferación celular actuando conjuntamente con la ruta JAK/STAT, además del requerimiento de la ruta EGFR para la apropiada delaminación y anoikis (anoikis es un tipo de apoptosis de ciertos tipos celulares inducido por la pérdida de contactos con la matriz extracelular de células dañadas en la infección (Buchon, *et al.*, 2010). Las moscas que carecen de esta ruta son muy susceptibles a la infección.

La **ruta de respuesta a estrés de p38 MAPK** ejerce control sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la oxidasa dual asociada a membrana (DUOX) en el intestino de *D. melanogaster*. Estas ROS son producidas constitutivamente por las células del intestino para controlar la microbiota, pero se ha

visto que DUOX es capaz de responder aumentando su expresión en presencia de patógenos. En condiciones normales, las bacterias no son reconocidas por PGRPs, sino por receptores acoplados a proteína G (G protein coupled receptor, GPCR) que transmite la señal a la fosfolipasa C β (PLC β), lo que lleva a la movilización de calcio intracelular mediante la generación de inositol-3-fosfato (IP3). Esto es suficiente para la activación de DUOX y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ryu, *et al.*, 2010). Los mutantes de *D. melanogaster* deficientes para la fosfolipasa C- β (responsable de la activación de la ruta) tienen reducida su esperanza de vida debido a la proliferación incontrolada en el intestino de los microbios presentes en la dieta. En condiciones infectivas se ha observado la inducción de esta ruta y se ha propuesto su activación a través de la ruta MEKK1-MKK3-p38, induciendo la síntesis de DUOX, así como una mayor cantidad de ligando que produciría una mayor movilización de calcio y, por tanto, induciría la activación de DUOX. La supresión de esta ruta activa la respuesta inmune (a través de Imd así como la expresión de AMPs) mimetizando la respuesta inmune en ausencia de patógenos (Ragab, *et al.*, 2011). Se propone que esta ruta es capaz de promover la proliferación celular y simultáneamente limita la respuesta inmune. En *M. sexta* y en *Aedes aegypti* se ha observado una inducción de p38 tanto a nivel transcripcional como traduccional después de la exposición a toxinas Cry (Cancino-Rodezno, *et al.*, 2010). En el invertebrado *C. elegans*, se ha visto el aumento de expresión de MAPK p38 (PMK-1) y SEK-1 tras la exposición a Cry5B (Huffman, *et al.*, 2004).

Además de estas rutas principales descritas, también existen otras rutas implicadas en la respuesta inmune frente a infecciones. Una de estas rutas es la **ruta JNK** (quinasas c-Jun N-terminal) y actúa en respuesta a señales de estrés y daño celular. Los componentes principales de esta ruta son MAP quinasas (Misshapen, Slipper, Hemipterous, Basket), un factor de transcripción (Djun) y un mecanismo de retroalimentación mediante una MAP quinasa fosfatasa (Puckered). En *C. elegans* se ha observado que esta ruta responde a la intoxicación con Cry5B aumentando su expresión (Huffman, *et al.*, 2004). Esta ruta además regula muchos procesos del desarrollo en *D. melanogaster* y es necesaria para la correcta cicatrización de la epidermis (Galko, *et al.*, 2004, Ramet, *et al.*, 2001). También se ha observado la implicación del sistema del **RNA de interferencia** en animales y plantas como mecanismo de defensa de las infecciones víricas. Se ha observado que la captación de dsRNA es esencial en la respuesta antiviral en adultos de *D. melanogaster* (Saleh, *et al.*, 2009).

Con el fin de regular la señal existen diferentes moléculas que modifican su expresión en respuesta a las infecciones (De Gregorio, *et al.*, 2001). Dentro de este grupo se encuentran moléculas capaces de amplificar la señal, como las **Serín proteasas** (Krem, *et al.*, 2002) y otras capaces de reducir esta señal, como los inhibidores de las Serín proteasas o **Serpinas** (Reichhart, 2005).

1.2.3 Componentes efectores de la respuesta inmune humoral y celular de insectos.

La respuesta inmune de insectos se caracteriza por ambos tipos de respuesta: humoral y celular, siendo la respuesta humoral la llevada a cabo por factores solubles mientras que la respuesta celular hace referencia a aquellos procesos que son llevados a cabo por las células del insecto.

Respuesta inmune humoral

Implica la secreción de factores en el sistema circulatorio abierto de los insectos. La mayoría de estos factores son producidos en el cuerpo graso del insecto (órgano homólogo al hígado en mamíferos) y son péptidos antimicrobianos y proteínas que se asemejan a los factores del sistema del complemento (complement like factors) (Beckage, 2008). Por lo tanto, la respuesta inmune humoral comprende la acción de los péptidos antimicrobianos (AMPs) y las especies reactivas de oxígeno (ROS), así como también los procesos de coagulación, melanización y opsonización.

Péptidos antimicrobianos

Los AMPs son péptidos pequeños que poseen propiedades antimicrobianas cuya función es matar a los microorganismos que invaden un organismo huésped. Se encuentran ampliamente distribuidos, tanto en animales como en plantas. Existe una base de datos de AMPs (<http://aps.unmc.edu/AP/main.html>) donde se pueden encontrar péptidos antimicrobianos, antivirales y antitumorales.

Se proponen distintos mecanismos de acción de los AMPs, entre ellos la permeabilización de la membrana del microorganismo (Matzusaki, 2009) y, en aquellos casos en que los AMPs son capaces de penetrar en el interior de la célula, su actuación directa sobre ciertas moléculas diana. Los AMPs son capaces de permeabilizar las membranas procariotas a causa tanto de la desestabilización de la membrana, debido al desplazamiento de los lípidos de ésta, como por la inserción de carga positiva en la membrana con carga negativa de la célula procariota. Una hipótesis para intentar explicar la especificidad de estas moléculas para no producir daño en las células eucariotas es precisamente debido a que su carga positiva (la

mayoría son catiónicos y anfipáticos), los AMPs son capaces de unirse a la membrana de procariontes que está cargada negativamente, pero no son capaces de unirse a las membranas eucariotas con fosfolípidos zwitteriónicos y colesterol (Shai, 2002). No obstante, existen excepciones a esta hipótesis de selección de la célula diana y en estos casos se sugieren otros factores responsables de la especificidad de tipo celular como lo son la estructura secundaria y terciaria del AMP (Ahmad *et al.*, 2006).

La regulación de la expresión de AMPs en insectos se debe a que en las regiones 5' de las secuencias que codifican para AMPs existen sitios de unión de Relish, análogos del sitio de unión del factor nuclear $\text{K}\beta$ ($\text{NFK}\beta$) (Zasloff, 2002). Se ha observado que la inyección de microbios induce rápidamente la transcripción de AMPs (Lemaitre, *et al.*, 1997). Una vez sintetizados, mayoritariamente en el cuerpo gordo, son liberados a la hemolinfa, donde su permanencia es muy variable y diferente en cada caso; por ejemplo, el AMP llamado Drosomicina es capaz de persistir hasta un mes en ella (Uttenweiler-Joseph *et al.*, 1998). Las vías de señalización de Toll e Imd son las responsables de la inducción de los AMPs. Algunos AMPs se encuentran conservados entre especies de insectos, como son la Cecropina, la Defensina y la Atacina pero otros son específicos de la especie o del orden, como por ejemplo la Drosomicina, la Dipterocina y la Metchnikowina que son específicos de *D. melanogaster* (Bulet, *et al.*, 1999, Imler, *et al.*, 2005, Levashina, *et al.*, 1998).

Un grupo especial de AMPs son las lisozimas, que son muridasas cuya función es la hidrólisis de los puentes entre las cadenas de peptidoglucanos que forman la pared celular de las bacterias, y de este modo causar la lisis celular. Se ha observado un incremento de su expresión después de la infección, tanto en *D. melanogaster* (Daffre, *et al.*, 1994) como en *B. mori* (Gandhe, *et al.*, 2007).

Especies Reactivas de Oxígeno

Las infecciones naturales por bacterias inducen una rápida producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), siendo una reacción obligatoria para mantener bajo control el crecimiento de las bacterias en el intestino (Figura 11). A pesar de tener las mismas dianas, la regulación de la producción de ROS en el intestino de *D. melanogaster* es muy distinta de lo que se ha descrito para los AMPs. Las ROS se producen en el intestino por DUOX, una NADPH oxidasa que produce H_2O_2 .

Aunque es capaz de controlar la microbiota intestinal, este sistema no es lo suficientemente potente para la eliminación de una infección bacteriana adquirida por vía oral. Cuando aumenta la carga bacteriana en el intestino, aumenta la expresión de DUOX, su actividad y consecuentemente la producción de ROS aumentan de forma drástica (Charroux, *et al.*, 2010). Además de su actividad microbicida directa podría

estar implicado en el mantenimiento de la homeostasis intestinal después de la infección ya que es esencial para la producción de Udp3 y la activación de JAK/STAT (Buchon, *et al.*, 2009).

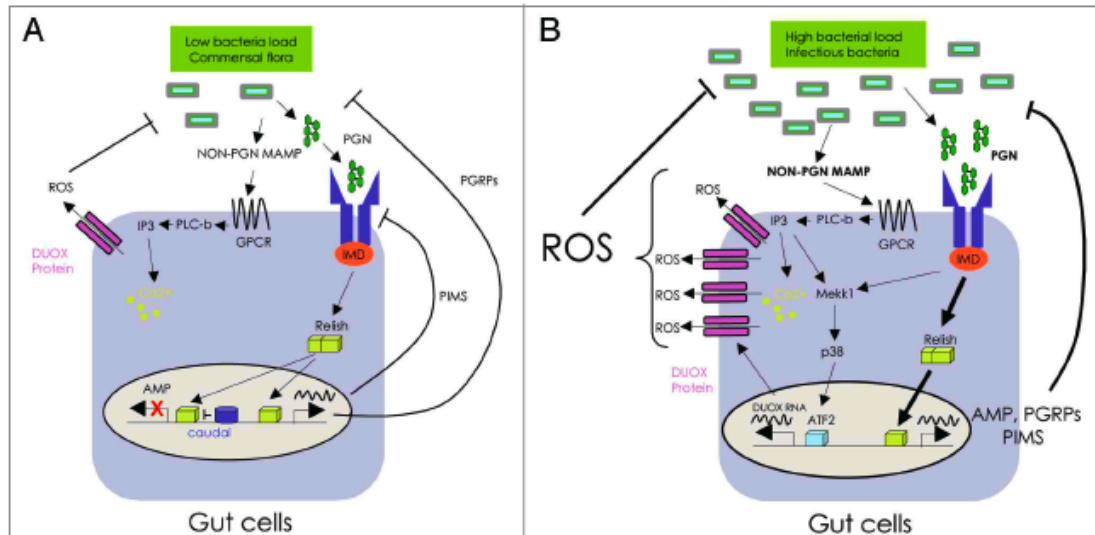


Figura 11. Control de la microbiota en el intestino por el sistema DUOX-ROS y su activación en presencia de patógenos. (Charroux, *et al.*, 2010)

Melanización

Este proceso se inicia mediante la activación de la Profenoloxidasa (proPO) por proteasas y a continuación la Fenoloxidasa oxida a los derivados de tirosina de las quinonas que polimerizan para formar la melanina. La melanina se deposita en el lugar donde se produce el daño en la cutícula o en la superficie de los parásitos invasores dando lugar a un ennegrecimiento en la zona. La melanización contribuye a la respuesta inmune aislando las rupturas cuticulares y secuestrando los microorganismos. Además, en los sitios de melanización se producen especies reactivas de oxígeno (Nappi, *et al.*, 1995) que actúan contra los patógenos. Algunas bacterias provocan una respuesta melanocítica en los foci de la infección (Brandt, *et al.*, 2007, Mansfield, *et al.*, 2003).

Oponización

La oponización es el proceso en el cual las opsoninas marcan el patógeno para su fagocitosis. Las opsoninas son moléculas que se unen a la membrana del patógeno intensificando su posterior fagocitosis (Blandin, *et al.*, 2004, Stroschein-Stevenson, *et al.*, 2006). Este proceso es llevado a cabo por las proteínas que contienen tioésteres (TEPs, ver apartado 1.2.1).

Coagulación

Este proceso es muy importante ya que limita la pérdida de hemolinfa y crea una nueva barrera para evitar infecciones, inmovilizando las bacterias y promoviendo su

muerte. En *D. melanogaster* se forma un coágulo compuesto de fibras que atrapan hemocitos en el lugar de la herida. Este proceso podría considerarse tanto humoral como celular ya que intervienen tanto moléculas efectoras solubles como hemocitos. El mayor componente de estas fibras es una proteína llamada Hemolectina (Goto, *et al.*, 2003). Este proceso es independiente de melanización y de la fenoloxidasa (Scherfer, *et al.*, 2004).

Respuesta inmune celular

Este tipo de respuesta se ha observado principalmente en los hemocitos presentes tanto en su forma libre circulante como sésiles. Estas células son capaces de llevar a cabo diferentes funciones en la respuesta inmune: fagocitosis, secreción de opsoninas y AMPs, encapsulación y nodulación. En la respuesta inmune celular se incluyen procesos como la fagocitosis, la encapsulación, y la proliferación y diferenciación celular.

Fagocitosis

La fagocitosis es la captación celular de un substrato particulado, siendo un proceso fundamental en organismos eucariotas y esencial en la limpieza de objetos dañinos en el organismo (Stuart, *et al.*, 2005). Este proceso requiere el reconocimiento de la partícula mediante unión al receptor seguido de la formación del fagosoma y la internalización de la partícula mediante procesos dependientes de actina (Agaisse, *et al.*, 2005, Pearson, *et al.*, 2003, Philips, *et al.*, 2005, Stroschein-Stevenson, *et al.*, 2006). Aunque ha sido ampliamente estudiado en hemocitos o en células especializadas en esta función, como los fagocitos, la capacidad de reconocer e internalizar objetos o sustancias es inherente a todas las células.

Encapsulación

La encapsulación es otro proceso celular en el cual los hemocitos (lamelocitos en *D. melanogaster*) son activados y forman una cápsula multicapa alrededor del objeto extraño. Para ello los hemocitos producen melanina y especies reactivas de oxígeno con el objetivo de matar al parásito que se encuentra en su interior (Nappi, *et al.*, 1995). Este proceso normalmente tiene lugar cuando los patógenos son de gran tamaño, como los parasitoides y los nematodos. No obstante, también se ha descrito encapsulación de células infectadas por baculovirus en *H. zea* y *M. sexta* (Washburn, *et al.*, 2000).

Nodulación

En la nodulación los hemocitos se agregan alrededor de focos de bacterias, hongos y virus. La diferencia con la encapsulación radica en el tamaño del patógeno, en la encapsulación se trata de patógenos de gran tamaño (Beckage, 2008).

Diferenciación y proliferación celular

En trabajos recientes, en adultos de *D. melanogaster*, se ha observado un aumento en la renovación del epitelio del intestino después de la infección oral con *Ecc15* (la cual no produce letalidad por vía oral en adultos) y con dosis subletales de *P. entomophila* (en cambio, a dosis letales esta renovación no tenía lugar) (Buchon, *et al.*, 2009). Esta proliferación celular en células madre del intestino de *D. melanogaster*, así como la diferenciación a enterocitos, está coordinada por la ruta EGFR (Buchon, *et al.*, 2010). También se ha observado que, en el intestino posterior de *D. melanogaster*, el daño celular es capaz de activar una población de células madre para la reparación del tejido dañado (Fox, *et al.*, 2009). En cambio, en lepidópteros como *S. exigua* no se ha observado un aumento de la proliferación celular tras la exposición de las larvas a un producto comercial (Xentari™) que contiene esporas y cristales de *B. thuringiensis* (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010).

1.2.4 El intestino de lepidópteros como barrera

El epitelio de los insectos se encuentra en constante contacto con microorganismos, por lo que debe tener sistemas de reconocimiento y control eficientes. Las dos principales vías de entrada de patógenos son las tráqueas y el intestino. La mayoría de patógenos entran en el insecto huésped por vía oral, siendo así el intestino la primera barrera con la que se encuentran, la cual el patógeno o sus factores de virulencia deben superar para tener éxito en la infección. Además de ser una barrera física, también se ha descrito la secreción de lisozimas, la producción local de AMPs y ROS como mecanismos de defensa en el intestino (Daffre, *et al.*, 1994, Hultmark, 1996).

El intestino de las larvas de lepidópteros se divide en 3 regiones: anterior (foregut), medio (midgut) y posterior (hindgut). El intestino medio es la región más larga y consiste en un epitelio simple o pseudoestratificado, que es mantenido por una membrana basal, músculo estriado y traqueolas. En el intestino medio de las larvas se encuentran tres tipos celulares (Figura 12): células madre (responsables de la renovación celular), enterocitos o células columnares (con función digestiva) y células globulares (implicadas en el transporte de K^+). Las células madre se encuentran en la parte basal y contribuyen a la renovación celular para reemplazar células dañadas y

contribuyen a la formación del intestino del adulto. Los enterocitos tienen microvellosidades en la parte apical orientadas hacia el lumen del intestino e invaginaciones basales que forman un laberinto implicado en la secreción de enzimas digestivos. Las células globulares poseen una cavidad grande cuya función es regular la secreción de K^+ . El intestino medio se encuentra delimitado por una membrana peritrófica, que es secretada a la superficie del lumen y sirve para proteger a las células tanto del daño mecánico como de patógenos (Lehane, 1997).

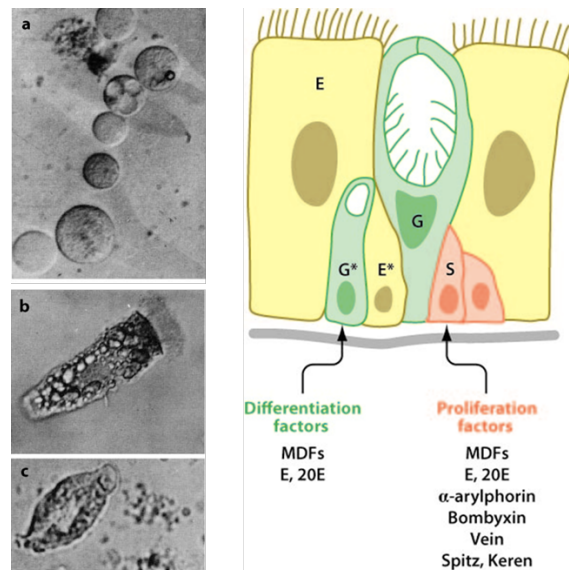


Figura 12. Tipos celulares del intestino de larvas de lepidópteros. (A) Células madre, (B) células columnares o enterocitos y (C) células globulares. A la derecha, un diagrama de la distribución de estas células en el intestino, así como los diferentes factores de proliferación y diferenciación (E: enterocito; G: célula globular; S: célula madre) (Hakim, *et al.*, 2010).

Aunque la expresión de AMPs se ha descrito mayoritariamente en células del cuerpo gordo, también se ha encontrado expresión de AMPs en células epiteliales. Este es el caso de larvas de *B. mori* que inducen la expresión de *cecropina* cuando son expuestas a bacterias (Brey, *et al.*, 1993). Más recientemente, en el intestino de larvas de *Trichoplusia ni* se ha encontrado la inducción de la expresión de genes que codifican para AMPs en el intestino medio de la larva cuando ésta ha sido expuesta a bacterias (Freitak, *et al.*, 2007).

Se han realizado diferentes estudios fisiológicos de respuesta en el intestino de insectos tras la exposición a entomopatógenos. En estudios de cultivo celular de células de intestino medio expuestas a toxinas de *B. thuringiensis* se ha observado que el efecto inicial es la reducción de la cantidad de enterocitos (que son las células diana de estas toxinas), una pequeña reducción del número de células globulares y un aumento de las células que se están diferenciando (Hakim, *et al.*, 2009). En estudios

de infecciones con baculovirus se ha observado el desprendimiento de células infectadas como mecanismo de defensa contra la infección, evitando o retrasando pasos posteriores de la infección (Hoover, *et al.*, 2000).

En estudios de genes de respuesta en intestino a entomopatógenos utilizando la bacteria *B. bombysepticus* se ha observado una fuerte respuesta transcripcional en el intestino. Entre los genes que modifican su expresión se encuentran genes que codifican proteínas de membrana peritrófica, receptores APN y proteínas de intercambio de sodio y calcio, además de genes implicados en la síntesis de la hormona juvenil y del metabolismo, así como en la respuesta inmune celular y serín proteasas. Se ha observado que la infección con *B. bombysepticus* induce principalmente la vía Toll y además, 24 horas después de la infección se observa un incremento de la expresión de AMPs (Huang, *et al.*, 2009).

1.3 *Spodoptera exigua*

Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae) (Hübner, 1808), también conocida como “rosquilla verde” o “gardama”, es una plaga polífaga ya que sus larvas pueden alimentarse de más de 200 especies de plantas, tanto cultivadas como malas hierbas (Gho *et al.*, 1993; Takatsuka y Kunimi, 2002). Entre los cultivos en los que podemos ver esta plaga se encuentran cultivos hortícolas como el tomate, el pimiento, el calabacín, la berenjena, el pepino y la judía verde, aunque también puede alimentarse de otros cultivos como plaga secundaria, por ejemplo en el algodón. *S. exigua* se encuentra ampliamente distribuida y actualmente se localiza en todo el mundo, sobretudo en regiones subtropicales y templadas (CIE, 1972) (Figura 13).

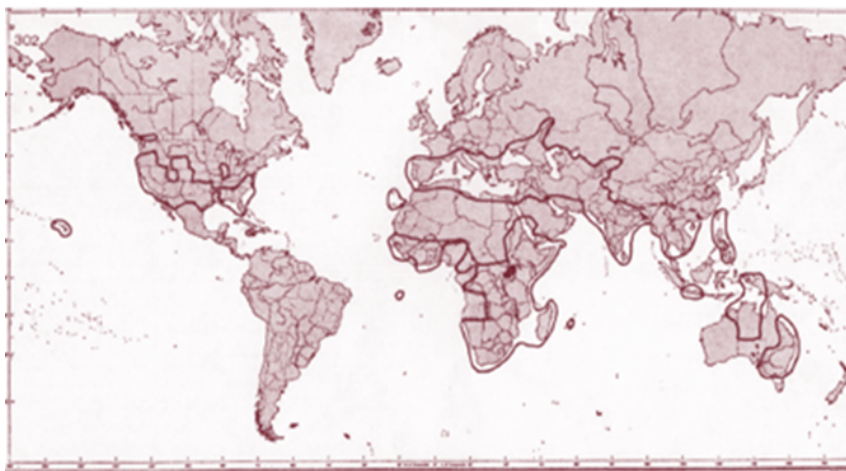


Figura 13. Distribución mundial de *S. exigua*. [Commonwealth International Institute. Pest Maps (<http://www.cabanstractsplus.org/DMPP/about.asp>)].

El ciclo de vida de *S. exigua* se divide en cuatro estadios de desarrollo: huevo, larva (con cinco estadios larvarios), pupa o crisálida y adulto o imago (Figura 14). Los adultos realizan las puestas de huevos en el envés de las hojas, en plastrones que contienen entre 10 y 200 huevos recubiertos por escamas de la hembra. Dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad, los huevos tardan en eclosionar entre cuatro y nueve días. Las larvas neonatas tienen un comportamiento gregario (se agrupan en los tallos o botones florales) hasta que alcanzan el tercer estadio larvario, en el cual comienzan a separarse y a vivir de forma aislada (García Marí, 1994). Durante el cuarto y quinto estadio las larvas producen gran cantidad de daños, ya que es cuando las larvas presentan un comportamiento más voraz. En estos estadios, las larvas se alimentan de la parte superior del cultivo (Belda *et al.*, 1994) e incluso pueden llegar a introducirse en el fruto (Lasa, *et al.*, 2007). Una vez completados los cinco estadios larvarios, las larvas descienden hacia las partes inferiores de las plantas y finalmente pupan en el suelo o bajo restos vegetales formando un capullo terroso. La fase de pupa puede durar de 7 a 18 días, el adulto que emerge de ella puede vivir entre 10 y 18 días. El ciclo en laboratorio se completa en tres semanas con condiciones constantes de temperatura ($25\pm 3^{\circ}\text{C}$), humedad relativa ($75\pm 5\%$) y un fotoperiodo de 16:8 (horas de luz: horas de oscuridad).

En la naturaleza, el número de generaciones anuales varía según las condiciones de temperatura: en regiones del norte y centro de Europa esta especie muestra una única generación, mientras que en regiones meridionales, así como en el norte de África, puede presentar varias generaciones anuales (de dos a seis) (García Marí, 1994).

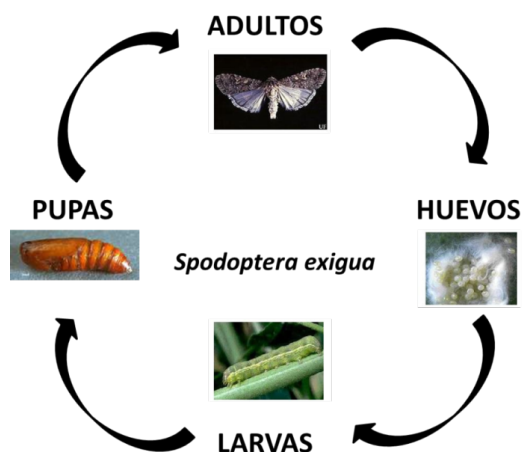


Figura 14. Ciclo biológico de *S. exigua*

1.3.1 Medidas de control en campo

S. exigua afecta a numerosos cultivos hortícolas produciendo daños severos y grandes defoliaciones. En España es una de las principales plagas del cultivo del pimiento en invernaderos de Almería, causando grandes pérdidas. Para su control, existen diferentes alternativas ya sea mediante compuestos químicos o mediante el empleo de sus entomopatógenos y enemigos naturales.

Durante las últimas décadas, el control de esta plaga se ha ido realizando mediante el empleo de plaguicidas químicos como clorados, carbamatos, organofosforados y piretroides. Actualmente para su control se emplean diferentes productos, como los reguladores de crecimiento (Tebufenocida y Metoxifenocida) y otros como el Spinosad (Moulton, *et al.* 1999). El empleo de estos plaguicidas químicos ha conllevado la aparición de grandes problemas como lo son la elevada presencia de residuos químicos tóxicos en los cultivos, el efecto negativo sobre otros insectos (como el polinizador *Bombus terrestris*) y sobre los enemigos naturales de la plaga que estarían ayudando a su control (Caballero *et al.*, 2009) y por último, el desarrollo de resistencias por parte de los insectos debido a la elevada exposición a estos químicos, lo cual ya ha sido documentado tanto en España (Torres-Vila *et al.*, 1998) como en el resto del mundo (Smagghe *et al.*, 1997; Mascarenhas *et al.*, 1998; Moulton *et al.*, 2002). Esta aparición de la resistencia supone una disminución en la efectividad de los plaguicidas reduciendo el número de productos efectivos para el control de la plaga (Cuadrado y Viñuela, 1998), lo cual supone un aumento del gasto para los agricultores.

Una de las posibles vías de control del lepidóptero plaga *S. exigua* es mediante el empleo de sus entomopatógenos naturales, entre los cuales se encuentran tanto bacterias, como virus, hongos y nematodos. En la actualidad se comercializan productos basados en dos agentes de control biológico de *S. exigua*, como son *B. thuringiensis* (Dipel[®] 2X, Javelin[®] o Xentari[®]) (Moar *et al.*, 1995, Kaur, 2000, Liburd *et al.*, 2000) y el nucleopoliedrovirus de *S. exigua* (Spod-X[®], Virex[®]) (Smits y Vlak, 1994, Lasa, 2007). Los productos basados en *B. thuringiensis* han mostrado ser menos eficaces en el control de esta plaga que otros, ya que las larvas de *S. exigua* parecen ser menos susceptibles a las toxinas Cry, siendo más tóxicas las proteínas Cry1C (de Maagd, *et al.*, 2000, Strizhov, *et al.*, 1996) y las menos tóxicas las proteínas Cry1A (Moar, *et al.*, 1990, Moar, *et al.*, 1995), las cuales son las más abundantes y comunes en los productos comerciales de esta bacteria. Los productos basados en baculovirus contienen una mezcla heterogénea de genotipos que difieren en su patogenicidad, virulencia y capacidad de producir OBs (Murillo, *et al.*, 2006, Muñoz y Caballero, 2000). El SeMNPV es uno de los baculovirus con mayor eficacia contra *S. exigua*

(Smits *et al.*, 1987) y cuyo espectro de huéspedes es muy reducido (Caballero *et al.*, 1992), siendo estas características favorables para su utilización como agente de control biológico. Además, *S. exigua* también se ve afectada por infecciones de hongos entomopatógenos como *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Nomuraea rileyi* (Barbercheck y Kaya, 1991, Kao y Tsai, 1989). Entre los nematodos entomopatógenos se ha observado susceptibilidad de *S. exigua* a *Steinernema feltiae* y a *Steinernema carpocapsae* (Shahidi Noghabi, *et al.*, 2006), siendo infectivos los estadios juveniles del nematodo. *S. carpocapsae* tiene una bacteria simbiote, *X. nematophila*, capaz de inhibir el sistema inmune de *S. exigua* (Ji, *et al.*, 2004) lo cual aumenta la eficacia del nematodo entomopatógeno en el control de esta plaga (Shahidi Noghabi, *et al.*, 2006).

Otra vía de control de esta plaga es mediante el uso de enemigos naturales. Se conocen varios enemigos naturales de este lepidóptero, como lo son depredadores y parasitoides. Los depredadores son los causantes de la mayor mortalidad de huevos y larvas de primer estadio en las poblaciones, siendo las principales especies depredadoras: *Lygus hesperus* (Miridae), *Nabis americanoferus* (Nabidae), *Orius tristicolor* (Anthocoridae), *Collops vittatus* (Melyridae) y *Hippodamia convergens* (Coccinellidae). En cuanto a especies parasitoides se han encontrado dos endoparásitos de larvas: *Hyposoter exiguae* y *Pristomerus spinator* (ambos Ichneumonidae), y un endoparásito de huevos: *Chelonus insularis* (Braconidae) (Ehler, 2007).

Adicionalmente también se emplean métodos preventivos y culturales para el control de esta plaga. Dentro de este tipo de métodos cabe destacar la colocación de pantallas o barreras para evitar o reducir la entrada de la plaga en el invernadero, el empleo de trampas de luz, así como la eliminación de malas hierbas que suponen un foco de infección que se mantiene entre cosechas (Sampson, *et al.*, 1998).

1.3.2 Respuesta a patógenos en *S. exigua*

Pese a no considerarse un animal modelo, existen diversos estudios de respuesta a patógenos en el lepidóptero *S. exigua*. Algunos de estos estudios de respuesta a patógenos que utilizan *X. nematophila*, bacteria simbiote de nematodos que produce inmunosupresión, han mostrado que tras la infección se reduce la expresión de la *cecropina* en el cuerpo graso de la larva (Ji, *et al.*, 2004) y, además, esta bacteria es capaz de inhibir la fagocitosis en los hemocitos (Shrestha, *et al.*, 2007). Más recientemente se ha observado que la inyección de *E. coli* produce como respuesta un aumento en la población total de hemocitos (Kim *et al.*, 2010), aunque se debe en gran

parte al aumento en el número de un tipo de hemocitos en concreto: las células granulares. También se han descrito algunos genes de péptidos antimicrobianos: Atacina y Gloverina. El homólogo al gen de la *atacina* se ha descrito en *S. exigua* tras la inyección de *E. coli* en cuerpo graso y con actividad contra diferentes especies bacterianas (Bang, *et al.*, 2011). La expresión de la *gloverina* se ha descrito en *S. exigua* en respuesta tanto a *E. coli* como a *Flavobacterium sp.* (Hwang, *et al.*, 2011)

En nuestro laboratorio estamos estudiando la respuesta de *S. exigua* a diferentes patógenos. En uno de los trabajos realizados en respuesta a la infección por baculovirus se observó la reducción de la expresión en el intestino de un gen que codifica para una proteína con afinidad para unir quitina (Jakubowska, *et al.*, 2010). Esta proteína era capaz de aumentar la permeabilidad de la membrana peritrófica y, por lo tanto, su reducción dificultaría la entrada del virus al ser esta primera barrera menos permeable. En otros trabajos también se describieron cuatro nuevos genes llamados *repat* (*respuesta a patógenos*) que aumentaban su expresión después de la exposición a Cry1Ca de *B. thuringiensis* y a baculovirus (Herrero, *et al.*, 2007).

1.4 Genes *repat*

Los primeros genes *repat* fueron descritos en el lepidóptero *S. exigua* por Herrero *et al.* (2007) como genes de REspuesta a PATógenos en intestino, concretamente a toxinas de *B. thuringiensis* (Cry1Ca) y a baculovirus. En este trabajo se encontró que estos cuatro genes, muy similares entre sí (Figura 15a), aumentaban su expresión al exponer las larvas a la toxina Cry1Ca cuando se comparaban con larvas control no expuestas.

Utilizando REPAT1 en la búsqueda de homólogos de estas nuevas secuencias en otros insectos, se encontraron ESTs en *Spodoptera frugiperda* que codificaban para polipéptidos similares a los REPATs (GenBank accession no. DV075894, DV075925 y DV076706). En estudios *in silico* de comparación de las secuencias se observó que el porcentaje de identidad entre las diferentes proteínas REPAT varía desde el 79% entre REPAT3 y REPAT4, hasta el 40% entre REPAT2 y REPAT4. En el caso de REPAT2, mostró mayor porcentaje de homología con las secuencias de *S. frugiperda* que con REPATs de *S. exigua* (Figura 15b). En todas las secuencias estudiadas hasta el momento se predijo una posible secuencia de péptido señal en las proteínas (Figura 15a).

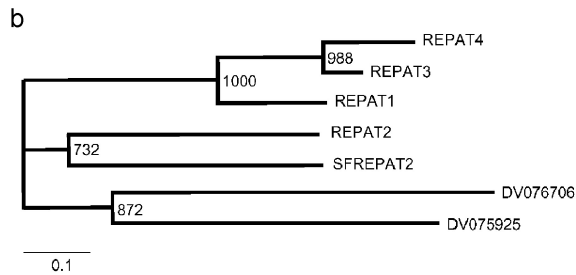
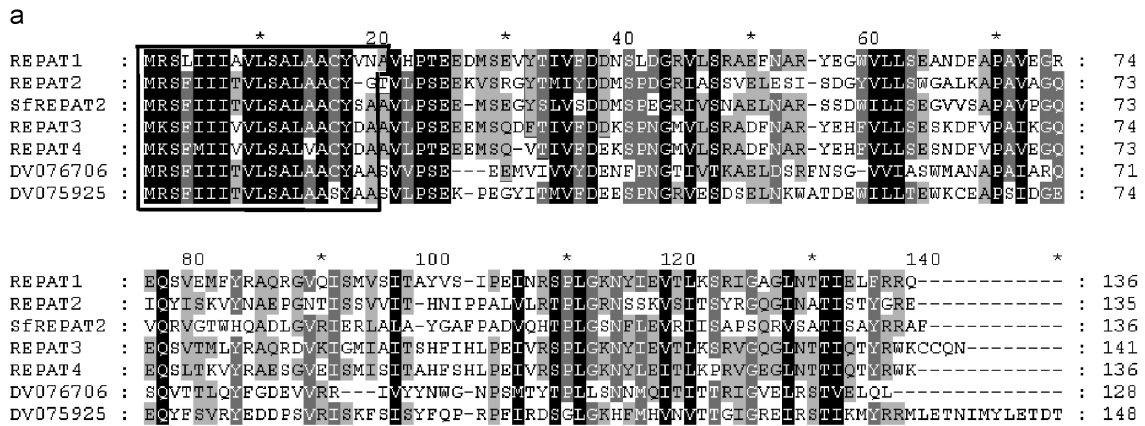


Figura 15. (a) Alineamiento con ClustalX de las secuencias aminoacídicas deducidas de las proteínas REPEAT en *Spodoptera* sp. (Los péptidos señal predichos están enmarcados). La secuencia EST DV075894 de *S. frugiperda* se ha nombrado como SfREPEAT2.

(b) Árbol filogenético derivado del alineamiento con ClustalX utilizando el método de Neighbor-joining. (Herrero, *et al.*, 2007)

En un estudio posterior (Hernandez-Rodriguez, *et al.*, 2009), sobre la estructura genómica de los genes *repat1* y *repat2*, se observó que ambos genes compartían la misma estructura: tanto *repat1* como *repat2* están constituidos por 3 exones y 2 intrones (Figura 16). Ambos genes presentan el exón 1 en la región 5'-UTR, siendo el exón 2 el que contiene el sitio ATG de inicio de la traducción y el exón 3 el codón de parada, así como la región 3'-UTR. No se encontraron elementos promotores típicos en las regiones 5'-UTR estudiadas de ambos genes *repat*.

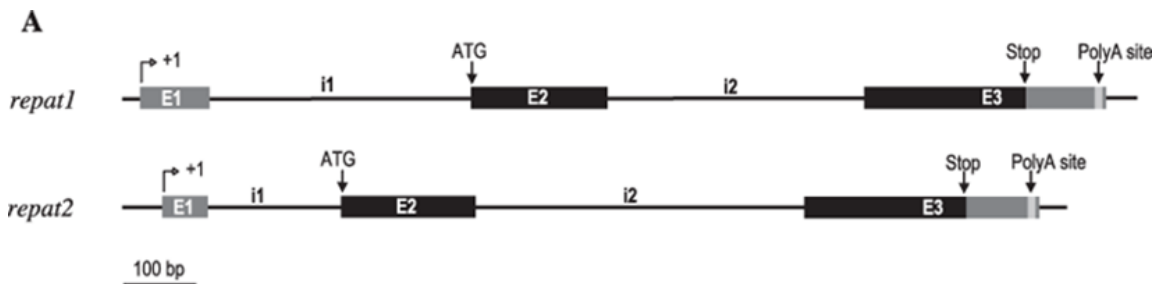


Figura 16. Estructura genómica de los genes *repat1* y *repat2*. Los exones (E1-E3) se representan por rectángulos y los intrones (i1, i2) por líneas. Las zonas 5'- y 3'-UTR están en color gris. Una flecha doblada indica el sitio putativo de inicio de la transcripción. (Hernandez-Rodriguez, *et al.*, 2009)

El patrón de expresión de los genes *repat* se estudió en larvas de quinto estadio de *S. exigua* que habían sido expuestas durante 5 horas a la toxina Cry1Ca de *B.*

thuringiensis. Se observó que la expresión de estos genes se encuentra restringida en el intestino de las larvas, no encontrando expresión ni en hemocitos ni en cuerpo graso (Figura 17A). En un trabajo posterior realizado en nuestro laboratorio sobre la actividad de la región promotora de *repat1* (Hernandez-Rodriguez, *et al.*, 2009) se confirmó esta especificidad de expresión en intestino, ya que la región promotora sólo mostraba actividad en células derivadas de intestino (HzGUT) pero no en células derivadas de ovario (Sf21). Además de la respuesta a *B. thuringiensis*, los genes *repat* también mostraron una respuesta a la infección producida por baculovirus (Figura 17B), aumentando la expresión de los genes *repat* en los momentos más tardíos de la infección, coincidiendo con el momento en el que se producen las infecciones secundarias del intestino.

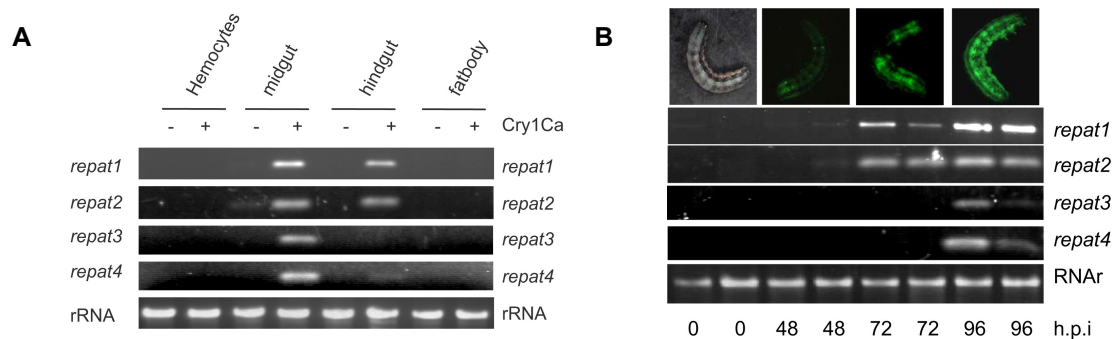


Figura 17. (A) Respuesta de los genes *repat* a la exposición a Cry1Ca en diferentes tejidos. (B) Cambios en los niveles de expresión de los 4 genes *repat* en respuesta a infección por baculovirus por PCR semicuantitativa. (Herrero, *et al.*, 2007)

Utilizando baculovirus recombinantes que expresaban la proteína REPAT1 se observó la producción de una proteína de mayor peso molecular que corresponde a la forma glicosilada. Mediante el uso de estos virus recombinantes con REPAT1, así como el mismo virus sin ningún gen adicional, se infectaron células Sf21 y larvas de *S. exigua*. Las infecciones en cultivo celular no mostraron diferencias significativas, en cambio las infecciones en larva mostraron que el tiempo medio para morir era mayor cuando la infección era producida por el baculovirus que contenía REPAT1. Este resultado sugiere una posible implicación de REPAT1 atenuando la virulencia del virus (Herrero, *et al.*, 2007).

Todos estos datos han contribuido a apoyar la idea de la implicación de los genes *repat* en la respuesta a patógenos. No obstante, aún se desconoce la función de estos genes, por lo que los principales objetivos de esta tesis se centran en avanzar y profundizar en el conocimiento de esta familia de genes, tanto hacia el conocimiento de su función como de su papel en la respuesta a patógenos.

OBJETIVOS

Para la realización de la presente Tesis Doctoral se planteó el estudio de la familia de genes de respuesta a patógenos *repat* y su implicación en la respuesta a entomopatógenos en el intestino de los insectos. El estudio de este objetivo se abordó mediante la realización de los objetivos más específicos que se describen a continuación:

1. Caracterización de los genes *repat* en *S. exigua*

- 1.1. Secuenciación y caracterización de nuevos genes *repat* que se detectan sobre-expresados en una población de insectos resistente a *B. thuringiensis*, y estudio de su efecto en la contribución a la resistencia.
- 1.2. Identificación de las proteínas que interaccionan con REPAT1.
- 1.3. Búsqueda y caracterización de genes *repat* en el transcriptoma de larvas de *S. exigua* expuestas a distintos patógenos.
- 1.4. Análisis del efecto de la exposición a diferentes patógenos en la expresión de los distintos genes *repat* en el intestino.

2. Caracterización de los homólogos de los genes *repat* en otros insectos

- 2.1. Identificación de genes homólogos a *repat* en otras especies de insectos.
- 2.2. Caracterización de los homólogos en *D. melanogaster* mediante el empleo de mutantes de ganancia y de pérdida de función.

CHAPTER 1:

High expression of novel *repat* genes in a Bt-resistant colony

These results are included in:

Hernandez-Martinez P, Navarro-Cerrillo G, Caccia S, de Maagd RA, Moar WJ, Ferre J, Escriche B, Herrero S. Constitutive activation of the midgut response to *Bacillus thuringiensis* in Bt-resistant *Spodoptera exigua*. PLoS One. 2010 Sep 17; 5(9). pii: e12795.

3.1 Introduction

One of the most serious problems in pest control is the evolution of resistance to the employed insecticide. Currently, cases of resistance to one or more types of insecticides have been described in more than 700 insect species (Bielza, 2005). Resistance may be defined as “a heritable change in the sensitivity of a pest population that is reflected in the repeated failure of a product to achieve the expected level of control when used according to the label recommendation for that pest species” (IRAC, 2007). Under permanent selection pressure, resistant insects outnumber susceptible ones and the insecticide is no longer effective. The speed with which resistance develops depends on several factors, including genetic factors. The knowledge of the genetic bases of the resistance would be essential for the development of strategies to delay the evolution of resistance in the field.

B. thuringiensis-based biopesticides are employed for the control of numerous species from Lepidoptera, Diptera, and Coleoptera (de Maagd, *et al.*, 2001). The ability of insects to develop resistance to *B. thuringiensis*-based formulated products and/or Cry proteins has been reported for many insect species, mostly in the order Lepidoptera (Ferre y Van Rie, 2002, Ferre, *et al.*, 2008). To date, resistance to *B. thuringiensis*-based formulated products has only evolved in populations of *Plodia interpunctella* (McGaughey, 1985), *Plutella xylostella* (Ferre y Van Rie, 2002) and *T. ni* (Wang, *et al.*, 2007), in stored grain and under field or greenhouse conditions, respectively. However, artificial selection using *B. thuringiensis* formulations or Cry proteins under laboratory conditions has generated *B. thuringiensis*-resistant colonies in many more insect species (Ferre, *et al.*, 2008). The most accepted and studied resistance mechanism is the reduction of Cry protein binding to the insect midgut. In some cases, this reduced binding is associated with mutations or altered expression of genes encoding cadherin, aminopeptidase N or alkaline phosphatase receptors (Gahan, *et al.*, 2001, Herrero, *et al.*, 2005, Jurat-Fuentes, *et al.*, 2004). These mechanisms that generally cause the highest levels of resistance have been usually found in insects selected for resistance to a single or few Cry proteins (Ferre y Van Rie, 2002, Bravo y Soberón, 2008). Other mechanisms of resistance in Lepidoptera have been associated with an alteration in proteolytic processing of Cry protoxins (Oppert, *et al.*, 1997), sequestering of Cry proteins by midgut esterases (Gunning, *et al.*, 2005) and lipophorin (Ma, *et al.*, 2005) and an increased recovery of midgut cells after Cry1Ac intoxication (Martínez-Ramírez, *et al.*, 1999). In *C. elegans* a defect in the synthesis of glycolipids that act as Cry5B receptors has been reported in Cry5B-resistant mutants (Griffitts, *et al.*, 2005, Griffitts, *et al.*, 2001).

Studies with *Epehstia kuehniella* [Zeller] showed an increase tolerance in larvae that were previously exposed to low concentrations of a mixture of spores and crystals of *B. thuringiensis* compared with non exposed larvae (Rahman, *et al.*, 2004) and this increase in tolerance was associated with an increase in factors related with the immune response. In transcriptional studies with *C. elegans* (Huffman, *et al.*, 2004), an activation of immune pathways like kinases was observed after exposure to Cry5B (Huffman, *et al.*, 2004, Young, *et al.*, 2004). Changes in the host's gene expression in response to bacterial or pore-forming toxins have been extensively monitored to identify genes and pathways involved in reducing the effect of the causal agent (Basset, *et al.*, 2000, Huffman, *et al.*, 2004). Most of these studies used whole organisms and only recently have these studies focused on the primary tissue associated with the penetration of bacteria into the insect: the gut. Moreover, these studies were performed in model invertebrates, such as *D. melanogaster* (Buchon, *et al.*, 2009) or *C. elegans* (Bischoff, *et al.*, 2004), with few studies carried out on Lepidopteran pests (Freitak, *et al.*, 2007, van Munster, *et al.*, 2007). Recent studies show that changing midgut proliferation is an important mechanism to overcome or attenuate the effect of bacteria ingestion in *D. melanogaster* (Buchon, *et al.*, 2009, Buchon, *et al.*, 2009, Cronin, *et al.*, 2009) and *Anopheles stephensi* adults (Baton, *et al.*, 2007). Also changes in gene expression after exposure to Cry proteins have been studied in Lepidoptera (Herrero, *et al.*, 2007, Meunier, *et al.*, 2006, Rodriguez-Cabrera, *et al.*, 2008, van Munster, *et al.*, 2007).

In previous studies, *S. exigua* midgut gene expression was compared between larvae exposed and non-exposed to the *B. thuringiensis* Cry1Ca toxin as well as to baculovirus infection (Herrero, *et al.*, 2007). A new gene family showing increased expression after exposure to different *B. thuringiensis* toxins and also after infection with baculovirus was identified. This new gene family was named as repat (response to pathogen). No homology of these proteins was found in the public sequence database, and nothing was known about their function at the molecular level. In recent studies, carried out in our laboratory, we were interested in identifying altered gene expression correlated with resistance to a *B. thuringiensis*-based formulated product. For this purpose a DNA-microarray was prepared with *S. exigua* midgut ESTs (expressed sequence tags) obtained from a suppression subtractive hybridization (SSH) library enriched for genes differentially expressed after feeding with *B. thuringiensis* Cry1Ca toxin (Herrero, *et al.*, 2005). We used the microarray to compare midgut gene expression between a colony of *S. exigua* susceptible and a colony highly resistant to the *B. thuringiensis*-based formulated product Xentari™, which contains Cry1Ca as the primary *S. exigua*-active Cry protein (Valent Bioscience Co., Libertyville). Results

showed strong over-expression of many genes that were also found up-regulated in susceptible insects after exposure to sublethal concentrations of Xentari™. Among the up-regulated genes, four ESTs with homology to the REPAT family and the *arylphorin* gene showed high levels of expression. One of these *repat* genes was previously described and named *repat4* (Herrero, *et al.*, 2007) but the other three ESTs were new members of the *repat* family.

Firstly, we decided to clone the three new *repat* genes found up-regulated in the Xentari resistant population and study their sequences together with the rest of the family as well as to confirm the macroarray data by quantitative PCR. Secondly, the Xentari resistant population was maintained without selection pressure. This new population showed a reduction in the resistance and consisted of a mix of susceptible and resistant phenotypes that allowed us to check if there is any linkage between gene expression and the resistance. A strong correlation was also found between *repat5* and *arylphorin* expression and the resistant phenotype. Moreover, a positive correlation between both genes was found indicating that they are part of the same biological process.

3.2 Material and Methods

***S. exigua* colonies, insect rearing and bioassays.**

S. exigua colonies were reared on artificial diet at 25±3 °C with 70±5% RH and a photoperiod of 16/8 h (light/dark). In these conditions, the *S. exigua* life cycle is completed in 25 days approximately. Larvae were maintained in rearing boxes and fed in an artificial diet (Annex I). When the larvae reached the last instar, they were transferred to new boxes with vermiculite shavings for the pupation. Subsequently, pupae were collected and placed into methacrylate cylinders covered with paper where adults layed eggs. Adults were fed with a solution of honey in water at 10%. Eggs were collected from cylinders and transferred to rearing boxes to continue the life cycle.

Three different colonies were used: FRA (a susceptible colony), Xen-R (Xentari-Resistant, a resistant colony to Xentari™) and Xen-RU (Xentari-Resistant Unselected, derived from Xen-R without selection pressure). The FRA colony was kindly provided by M. López-Ferber, INRA (St Christol les Alés, France). This colony had been maintained for at least 10 years without *B. thuringiensis* exposure and was used as control (susceptible colony). The resistant colony Xen-R was initiated from approximately 20,000 individuals (100 egg masses) collected from in June-July, 1994 in cotton fields in Prattville, AL, USA. The initial colony was selected for several years

with increasing concentrations of Xentari™ containing *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* (Valent Biosciences; containing Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C, Cry1D, and Cry2Ab) in the Department of Entomology, Auburn University, Auburn, AL. Once the resistant colony was established it was maintained with a constant selection protocol. Briefly, neonate larvae were reared for five days on artificial diet containing Xentari™ (10 mg/gram of diet). Survivors were transferred to untreated diet to complete their life cycle. The resistant Xen-R colony was also sent to the University of Valencia and divided into two different colonies where it was selected every two generations under the same conditions described above in order to maintain selection pressure. The Xen-RU was reared without exposure to the commercial product for at least 8 generations.

Susceptibility of fourth instar larvae was determined in growth inhibition assays using surface contamination as previously described (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2008). All assays were repeated at least 3 times for each colony. Resistant ratios (RR) were obtained as the quotient between the LC₅₀, IC₅₀, and IC₉₅ of the resistant colony and its counterpart value for the susceptible colony, respectively.

Cloning and sequencing of novel *repat* genes

For the cloning of novel *repat* genes a *S. exigua* midgut cDNA library constructed with the CloneMiner™ cDNA library construction kit (Invitrogen, USA) was used (the library construction is detailed in chapter 2). Gene-specific primers (based on the known EST sequences and previously used for the validation of macroarray data by RT-qPCR) (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010), and primers M13 forward and reverse from the vector pDONR222 (CloneMiner™Kit, Invitrogen) were employed for PCR amplification of the new *repat* 5' and 3' fragments (Table 1.1). Amplified fragments were cloned into pGemT-easy (Promega, USA) following manufacturer's instructions. After that, plasmids were isolated using the High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Germany). Clones were sequenced in Servicio de Secuenciación de la Universidad Politécnica de Valencia-CSIC. Sequences were analyzed and edited using the Seqman program (DNASTAR package). Alignment and phylogenetic tree construction with the deduced amino acid sequences of REPAT proteins was performed using the ClustalX program. Phylogenetic reconstruction was obtained by the neighbour-joining method together with bootstrap analysis using 1000 replicates. Kimura correction for multiple substitutions was applied.

Table 1.1 Primers used for cloning of novel *repat* genes and for RT-qPCR

Gene name	Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>repat4</i>	Repat4F	CGGCGGTTGAAGGCTAAGA
	Repat4R	CAGTTATAGAGATCAATGCTGATTTCTGA
<i>repat5</i>	Repat5F*	AAGTGGAAATGTGACGCTCCTT
	Repat5R*	CGGGAGGTCCATCAAAAAGTC
<i>repat6</i>	Repat6F*	CGGTTGTTTCCCTGGATGAT
	Repat6R*	GGATGAAATGAGAAGTTATAGCGATCA
<i>repat7</i>	Repat7F*	TTCGTGCCAACGGTTGAAG
	Repat7R*	TTTTGATGTCACTCTCAGCTCGAT
<i>arylphorin</i>	ArylF	CCGAGGTACCCGAGTTCT
	ArylR	AGCTTTGCATTTTTGTGCGATA
<i>ATPsynthase subunit C</i>	ATPsynF	GTTGCTGGTCTGGTGGGATT
	ATPsynR	AGGCCTCAGACACCATTGAAA
	M13F (-20)*	GTAAAACGACGGCCAG
	M13R*	CAGGAAACAGCTATGAC

* Primers used for cloning and sequencing.

Quantitative Real Time PCR (RT-qPCR)

Total RNA was extracted from *S. exigua* midguts using Trizol (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The quality and quantity of total RNA were determined spectroscopically at 230, 260, and 280 nm. Total RNA from different midgut samples used in this study was treated with DNaseI (1U/500 ng RNA, Invitrogen) prior to being reverse-transcribed into cDNA using an oligo-dT primer with SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen). The reverse transcriptase (cDNA) product was diluted 1:10. Specific primers used in RT-qPCR are previously shown in Table 1.1. The amplification reaction was performed using the SYBR Green RT-PCR kit (Applied Biosystems), final volume for each reaction was 25 µl: 12.5 µl of SYBRGreen kit, 5µl of cDNA, 1.5 µl of each primer (2.5 µM) and 4.5 µl of distilled water. The conditions of the reactions were the followings: 40 cycles of 20 s at 95 °C, 30 s at 56 °C and 30 s at 72 °C. The product accumulation was detected in real time as increase of the fluorescence that was collected on ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Expression levels were all normalized against expression levels of a house-keeping gene (*ATPsynthase subunit C*) and the expression ratios were calculated in relation to the FRA colony using different pools of FRA larvae with similar mean weight that the S- and B- Group using the formula described by Herrero *et al.*, 2007:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gene a, Xen-RU exposed}} - Ct_{\text{ATP-synth, Xen-RU exposed}}) - (Ct_{\text{gene a, FRA}} - Ct_{\text{ATP-synth, FRA}})$$

Where Ct is the value of the cycle that the amount of fluorescence collected exceeds the selected threshold. This threshold should be over the baseline and in the range of exponential growth in the curve.

Analysis of correlation between gene expression and resistance

Second instar larvae from Xen-RU were exposed to a sublethal dose of Xentari™. A total of 205 synchronous larvae were selected and fed for 6 days on artificial diet containing Xentari™ at 25 µg/cm² using the surface contamination method. At the end of the assay, larvae were weighed individually, midguts dissected, and immediately stored at -80 °C for further analysis. Moreover a total of 75 second instar larvae from Xen-RU were fed for 6 days without exposure and were weighed individually at the end of the assay. Subsequently, final weights of tested larvae were distributed in 5 mg intervals using GraphPad Prism 5 program (GraphPad Software Inc., San Diego). Midguts from individual insects highly affected (<15 mg of weight; called S-group) and from insects hardly affected by Xentari (>35 mg of weight; called B-group) were used for measuring the expression level of the candidate genes.

Correlation between gene expression level and larval weight (a measurement of resistance) was analyzed using the Pearson correlation coefficient *r*, using the GraphPad Prism program (GraphPad software Inc., San Diego) and two tail *p-values*. Correlation quantifies how well two variables vary together (Table 1.2). These can be used because both variables are outcomes of the measure. The Pearson correlation coefficient assumes that both variables are sampled from populations that follow a Gaussian distribution.

Table 1.2 Theoretical correlation values.

Value of <i>r</i>	Interpretation
1.0	Perfect correlation
0 to 1	The two variables tend to increase or decrease together.
0.0	The two variables do not vary together at all.
0 to -1	One variable increases as the other decreases.
-1.0	Perfect negative or inverse correlation.

If Pearson *r* is far from zero, the correlation could have four possible explanations: i) changes in the X variable change the value of the Y variable, ii) changes in the Y variable change the value of the X variable, iii) changes in another variable influence both X and Y, iv) or X and Y do not really correlate at all, and you just happened to observe such a strong correlation by chance. The *p-value* quantifies the likelihood that this could occur. One way to interpret the value of *r* is to square it to calculate *r*². It is a

value that ranges from zero to one, and is the fraction of the variance in the two variables that is “shared”. For example, if $r^2=0.59$, then 59% of the variance in X can be explained by variation in Y. Likewise, 59% of the variance in Y can be explained by variation in X. More simply, 59% of the variance is shared between X and Y.

3.3 Results

Three new members of the REPAT family.

In previous DNA-microarray studies, three new ESTs similar to *repat* genes showed up-regulation in a Xentari resistant colony (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010). This increase in the expression was confirmed by RT-qPCR (Table 1.3).

Table 1.3 Relative expression of the new *repat* genes found in Xen-R insects.

Clone	Expression Ratio (SD)		BLASTX sequence homology (new name)	GenBank EST accession n°
	DNA-array	qRT-PCR		
5g10	13.6 (0.7)	6.8 (7.3)	<i>repat2</i> -ABO64232 (<i>repat6</i>)	HO001693
6b8	10.9 (0.7)	5.6 (6.1)	<i>repat4</i> -ABO64234 (<i>repat7</i>)	HO001704
1b2	8.5 (0.7)	46 (54)	<i>repat2</i> -ABP64232 (<i>repat5</i>)	HO001678

Using the *S. exigua* cDNA library, 5' and 3' fragments for each sequence were amplified and cloned. Complete mRNA sequences from the 3 genes were obtained by assembling the overlapping fragments. The sequenced cDNAs had total lengths of 564, 580, and 553 bp for *repat5* (GenBank FJ595234), *repat6* (GenBank FJ595235) and *repat7* (GenBank FJ595236), respectively.

Proteins of 140, 131, and 169 amino acids were predicted from their respective cDNA sequences (Fig 1.1A). As occurred with previously described REPAT proteins, analysis of new REPAT proteins predicted the presence of a secretory signal peptide in their N-terminal region. Screening of the predicted proteins for the presence of known domains against the Conserved Domain Database (CDD) (NCBI database) retrieved no significant homology.

The predicted protein sequences and previously described REPAT protein sequences from *S. exigua* were aligned using the Clustal W algorithm and a phylogenetic reconstruction by Neighbour-Joining trees (Fig 1.1B) revealed the clustering of REPAT1, REPAT3, REPAT4 and REPAT7 proteins and a more divergent branch comprising the remaining *S. exigua* REPAT proteins. The percentage of identity

among the different REPAT proteins ranged from 79% between REPAT3 and REPAT4 to 21% between REPAT6 and REPAT7 (Fig 1.2).

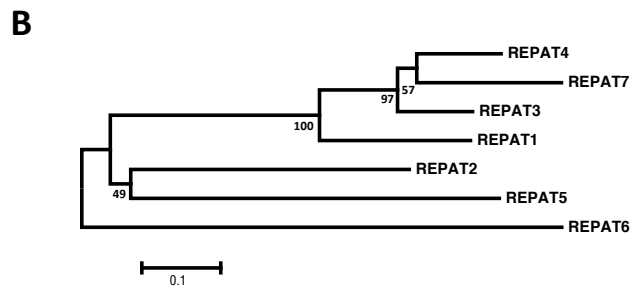
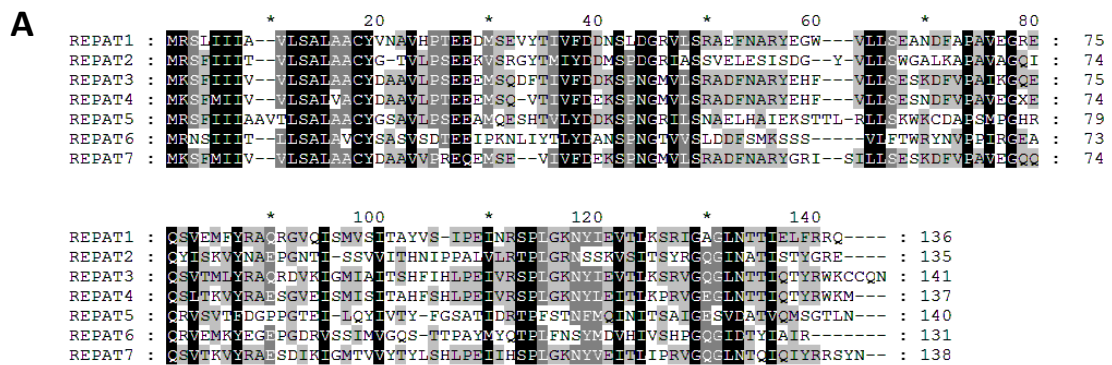


Figure 1.1 Sequence comparison of novel REPAT proteins. (A) Alignment of the deduced amino acid sequences from novel REPAT proteins. (B) Phylogenetic tree derived from the ClustalW alignment by the neighbour-joining method. Bootstrap values are shown only for the two main branches.

REPAT1	100%						
REPAT2	42%	100%					
REPAT3	65%	40%	100%				
REPAT4	65%	38%	79%	100%			
REPAT5	37%	41%	35%	34%	100%		
REPAT6	30%	33%	31%	28%	29%	100%	
REPAT7	59%	39%	72%	76%	34%	32%	100%
	REPAT1	REPAT2	REPAT3	REPAT4	REPAT5	REPAT6	REPAT7

Figure 1.2 Percentage of identity among the different REPAT proteins based in the predicted amino acid sequence.

Reversion of resistance in Xen-RU colony.

We decided to check for reduction of the susceptibility using the Xentari resistant colony (Xen-R) and the resistant without the selection pressure (Xen-RU). GI_{50} values for Xen-RU revealed a significant reduction (Ancova test; p -value <0.05) in resistance levels when selection was discontinued (RR of 12 (GI_{50}) or 78-fold (GI_{95})). These results indicate that resistance was not fixed (Table 1.4).

Table 1.4 Toxicity of Xentari in the different colonies from *S. exigua*.

Colony	LC ₅₀ (FL _{95%}) ^a	RR ₅₀ ^b	GI ₅₀ (FL _{95%}) ^c	RR ₅₀ ^b	GI ₉₅ (FL _{95%}) ^c	RR ₉₅ ^b
FRA	1 (0.4-2)	-	2 (1-6)	-	27.4 (11-139)	-
Xen-R	>1000	>1000	133 (46-383)	53	3767 (1069-42560)	138
Xen-RU	ND	ND	24 (5-62)	12	2118 (830-8851)	78

^aLC₅₀ (50% Lethal concentration) values were measured for neonate larvae. Concentrations are expressed as ng/cm². FL_{95%} (95% Fiducial limit).

^b The RR (resistance ratio) is obtained by dividing the LC₅₀ or the GI of the resistant colony by the LC₅₀ or the GI of the susceptible (FRA) colony.

^c GI₅₀ (50% growth inhibition) and GI₉₅ (95% growth inhibition) values are measured for 4th instar larvae. Concentrations are expressed as µg/cm².

ND, not determined.

Due to this increase in susceptibility in the Xen-RU colony we expected to find a mixture of susceptible and resistant phenotypes in it. If confirmed, this variation could be used to check possible linkages between XentariTM resistance and gene expression. In order to discriminate between susceptible and resistant individuals, second instar Xen-RU larvae were fed for 6 days on artificial diet containing a sublethal concentration of XentariTM. Distribution analysis of larval weight (Fig 1.3) revealed a wide growth response in the presence of XentariTM with values ranging from 4 mg to 55 mg per larva with an average weight of 15.96 mg (SD= 8.90) per larva. Non-exposed insects (dark curve in figure 1.3) showed different distribution of larval weight: exposed insects curve was displaced increasing the frequency of larval with low weight due to the exposure to XentariTM. Average weight for non-exposed insects was 31.5 mg (SD= 14.51) per larvae, confirming the presence of susceptible as well as resistant phenotypes (Fig 1.3).

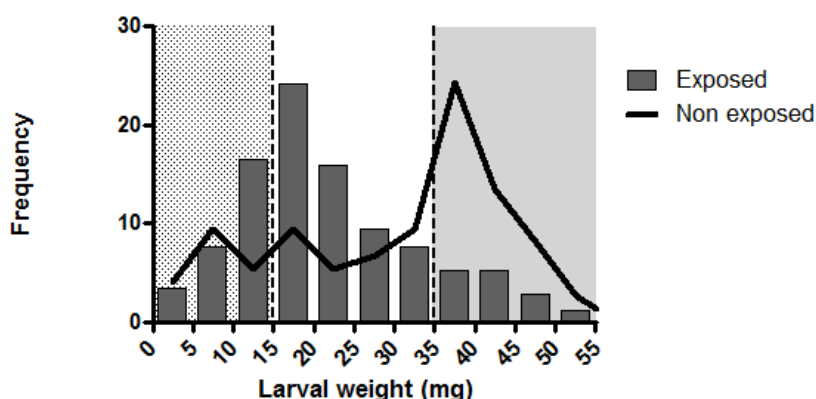


Figure 1.3 Larval weight distribution (5 mg-intervals) after feeding for 6 days of second-instar larvae on artificial diet containing 25 µg/cm² of XentariTM product. Two groups of insects were used in further analyses: the S-group (dotted background) included small larvae (susceptible) with a larval weight below 15 mg and the B-group (grey background) included big larvae (resistant) with a larval weight above 35 mg. Dark curve shows the distribution of the non exposed larvae.

***Repat5* and *arylphorin* overexpression correlates with resistance to Xentari™.**

Two groups of insects were selected for the study of the correlation between gene expression and the resistance. The highly susceptible S-group had larval weights below 15 mg. The highly resistant B-group had larval weights above 35 mg. Insects from both groups were dissected and the relative midgut gene expression was determined using RT-qPCR (Fig 1.4). The expression ratio was calculated in relation to the FRA colony using different pools of larvae of similar larval instar and weight for the analysis of the relative expression in the S- or B-group. Results from the correlation analysis between the different pairs are summarized in Table 1.5.

For the four *repat* genes tested, only in the case of *repat5* a positive significant correlation with the increase in the larval weight (resistance) was observed. Also *arylphorin* showed a positive correlation with the larval weight. Significantly ($p < 0.05$), higher *repat5* and *arylphorin* expression were found from the B-group compared to the S-group (Table 1.5), although no differences were detected for *repat4*, *repat6* and *repat7*.

Table 1.5. Gene expression ratio average for the studied genes and correlation analysis between gene expression and larval growth summary.

Gene	Average expression (SD)		Pearson r	p-value
	S-group	B-group		
<i>repat4</i>	7.3 (11.4)	3.6 (10.9)	-0.177	0.366
<i>repat5</i>	2.4 (2.1)	49.5 (69.9)	0.546	0.003
<i>repat6</i>	5.4 (7.9)	3.5 (3.4)	-0.106	0.599
<i>repat7</i>	2.9 (3.5)	4.4 (9.7)	0.149	0.450
<i>arylphorin</i>	0.5 (0.6)	42.7 (47.9)	0.572	0.003

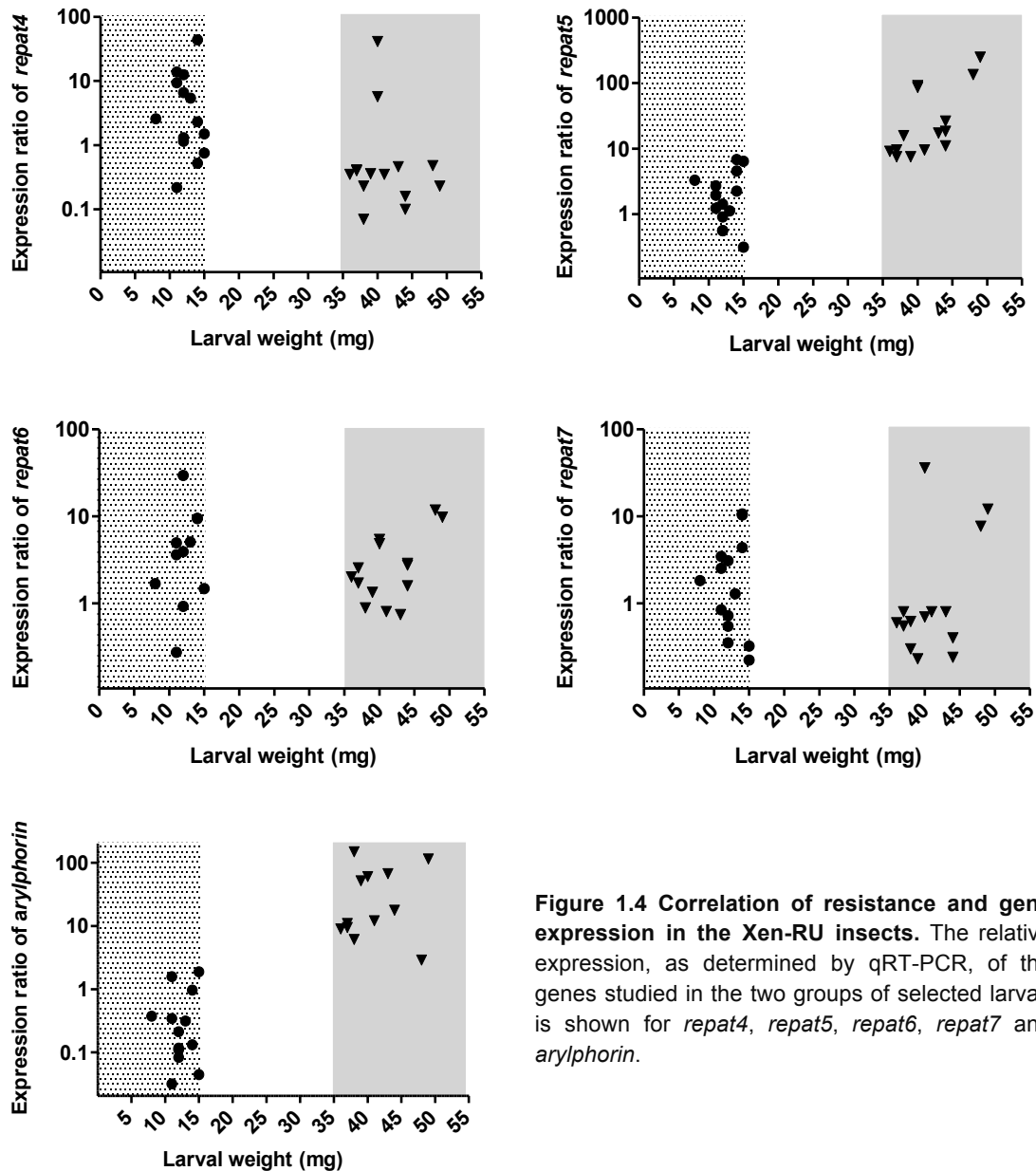


Figure 1.4 Correlation of resistance and gene expression in the Xen-RU insects. The relative expression, as determined by qRT-PCR, of the genes studied in the two groups of selected larvae is shown for *repat4*, *repat5*, *repat6*, *repat7* and *arylphorin*.

***Repat5* overexpression correlates with *arylphorin* overexpression.**

As *repat5* and *arylphorin* correlated with the weight increase also it was interesting to know if the expression of both genes correlated and so they are involved in the same biological process. For that reason, using the previous data of RT-qPCR, a correlation analysis of both genes was performed. Expression of *repat5* correlated with *arylphorin* expression (Pearson r 0.51, p -value 0.01) suggesting that both genes encode proteins involved in the same process or controlled by the same elements (Fig 1.5).

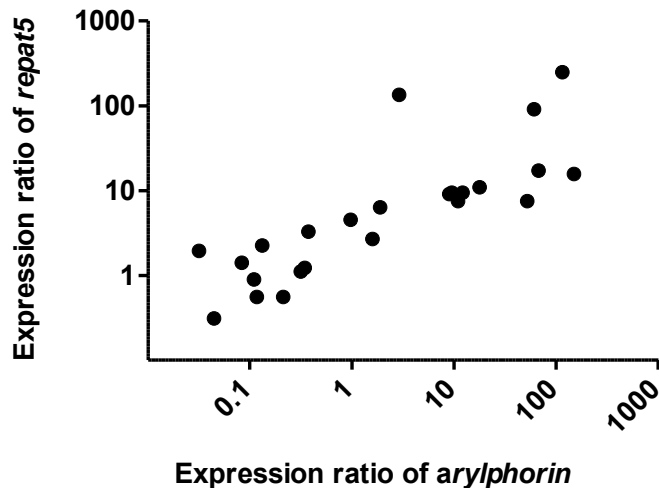


Figure 1.5 Correlation analysis between the expression ratio of *repat5* and *arylphorin* in individual larvae from the Xen-RU colony.

3.4 Discussion

Previously, in Herrero *et al.* (2007), an increased expression of four *repat* genes was observed in response to Cry1Ca and Cry1A toxins as well as to baculovirus infection, and this increased expression showed a correlation with the toxicity, showing a stronger relationship between the binding ability of the toxin to the gut receptors and a higher expression. The first four *repat* genes were identified using DNA-microarray based in the same EST library used for the DNA macroarray experiments where *repat5*, *repat6* and *repat7* were found (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010). Interestingly, despite both array experiments are based in the same EST library and so the seven *repat* genes were present in both experiments, they showed a different expression pattern in response to Cry1Ca exposure and the exposure to Xentari™. Only one *repat* gene was found in both cases: *repat4*. This could be due to the fact that different types of REPAT proteins could be involved in different responses depending of the entomopathogen or the toxin product used. Homologs to *repat* in *S. frugiperda* have also been detected in cDNA libraries obtained from the insect midgut intoxicated with Cry1C or exposed to xenobiotics (Negre, *et al.*, 2006; Rodríguez-Cabrera, *et al.*, 2008), supporting the idea of different *repat* genes could respond to different pathogens.

A reversion of the resistance was found when the Xen-R population was maintained at least 8 generations without the selection pressure, obtaining the Xen-RU colony and indicating that resistance was not fixed in Xen-R. In most studies on resistance to *Bt* products it has been observed that resistance reverted once selection ceased, most likely owing to fitness costs associated with resistance genes or with

other loci closely linked to these (Ferre y Van Rie, 2002). However, there are some cases in which resistance levels remained stable after the selection pressure ceased, for example in *P. interpunctella* colony 343-R (McGaughey, 1985, Oppert, *et al.*, 2000) and *P. xylostella* colonies (Tabashnik, *et al.*, 1993, Liu, *et al.*, 1996, Perez y Shelton, 1997). We confirmed that the Xen-RU colony had a mixture of susceptible and resistant colonies because it showed a wide growth response in the presence of Xentari™. This mixture of phenotypes could be used to check the different expression pattern between susceptible and resistant insects from the same population and so study possible linkages between gene expression and resistance.

To test if there was a correlation between the resistance and the *repat* expression we used a sub-lethal dose of Xentari™ that produces growth inhibition in 5th instar larvae. The correlation of increase in the larval weight and the expression of *repat5* and *arylphorin* was positive, indicating that those larvae that are able to grow better in the presence of Xentari™ and therefore, more resistant, had increased levels of *repat* expression. The relevance of the over-expression of *repat5* and *arylphorin* found in Xen-R is supported by the correlation found between gene expression and larval susceptibility to Xentari™ in Xen-RU. Surprisingly, this correlation was not found for *repat4*, *repat6*, and *repat7* suggesting that the contribution of these genes to Xentari™ resistance in Xen-R is not as important as the contribution of *repat5* and *arylphorin*, or their effect might be masked by the effect of the later genes in our analysis.

Expression levels of *repat5* and *arylphorin* also were checked and showed a strong correlation, suggesting that both genes may be part of the same biological process. Arylphorin is an insect hexamerin and it is described as storage protein as source of aminoacids. Also it is used to induce proliferation in stem cells culture (in a low dose acts as a mitotic factor but in high dose inhibits cell proliferation (Hakim, *et al.*, 2007). Moreover, *arylphorin* is inducible upon immune challenge (Asgari, *et al.*, 2004, Freitag, *et al.*, 2007). Due to the reported involvement of the arylphorin as a mitogenic factor in isolated stem cells from other Lepidoptera (Blackburn, *et al.*, 2004, Hakim, *et al.*, 2007) and some studies of *D. melanogaster* midgut (Buchon, *et al.*, 2009) that showed a higher epithelial renewal after ingestion of pathogens (as *Erwinia carotova carotova* and *Serratia marescens*), also midgut proliferation rate was studied in the Xen-R insects as well as in susceptible (FRA) exposed insects (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010). Interestingly, there was a lower proliferation rate in Xen-R as well as no changes were observed when susceptible insects were previously exposed to Xentari™, meaning that this colony is not responding to the exposure by activation of the cell proliferation.

In summary, four *repat* genes showed up-regulation in the Xen-R population, three

of them were new. A reversion of the resistance was observed in the Xen-RU population, which was a mixture of resistant and susceptible phenotypes. Results also show possible associations between *repat* and *arylphorin* expression (or the genes governing their expression) and resistance to Xentari™. Additional studies would contribute to identifying the mutation(s) in genes involved in the midgut response to pathogens and to clarify the role of *repat* and *arylphorin* in response to pathogens.

CHAPTER 2:

Functional interactions between members of the REPAT family of insect pathogen-induced proteins

These results are included in:

Navarro-Cerrillo G, Ferre J de Maagd RA, Herrero S. Functional interactions between members of REPAT family of insect pathogen-induced proteins. *Insect Molecular Biology*. doi: 10.1111/j.1365-2583.2012.01139.x

4.1 Introduction

The insect gut is the main route of entrance for many important entomopathogens. To block their entrance and to reduce the chance of establishment of a lethal infection, as well as to minimize the detrimental effects of the pathogen and its virulence factors, insects have developed different defense mechanisms that may act simultaneously. These mechanisms include the production of reactive oxygen species (ROS) (Buchon, *et al.*, 2009), activation of detoxification and damage-repair systems (Loeb, *et al.*, 2001, Li, *et al.*, 2006) synthesis of antimicrobial peptides (Cheng, *et al.*, 2006, Freitak, *et al.*, 2007), melanisation (Ma, *et al.*, 2005), phagocytosis (Rivkin, *et al.*, 2006) cell apoptosis (Blissard, *et al.*, 1990), and cell sloughing (Washburn, *et al.*, 2003), among others.

Bacillus thuringiensis is an entomopathogenic bacteria commercially used for the control of numerous species of Lepidoptera, Diptera, or Coleoptera. The pathological effect of *B. thuringiensis* starts in the midgut of the larvae and is mediated by the effect of crystal (Cry) proteins that are produced during bacterial sporulation and accumulated as crystalline inclusions (de Maagd, *et al.*, 2001). Cry proteins are pore-forming toxins that, after solubilization and activation in the insect midgut, bind to specific receptors in the microvilli of midgut epithelial cells. Due to their specific binding and to the physiological characteristics of the insect midgut, these toxins are highly specific to some insects and innocuous to humans, other vertebrates and plants (Schnepf, *et al.*, 1998).

Although several studies have been carried out to determine the main components involved in the insect response to *B. thuringiensis* and its toxins, only few genes and pathways have been described so far. Studies of the transcriptional response of larvae exposed to sublethal doses of Cry1Ab toxin in *Choristoneura fumiferana* and *Manduca sexta* mainly showed the regulation of metabolic and stress-related genes after toxin exposure (Meunier, *et al.*, 2006, van Munster, *et al.*, 2007). More recently, Cancino-Rodezno *et al.*, 2010 (Cancino-Rodezno, *et al.*, 2010) have shown the involvement of the mitogen-activated protein kinase p38 on the defense of different insect orders against Cry toxins. Previous study in our laboratory identified a gene family that was highly up-regulated after ingestion of Cry1Ca toxins (Herrero, *et al.*, 2007). Because these genes were also up-regulated when insects were exposed to *B. thuringiensis* and baculovirus, we named this family *repat* (**R**esponse to **P**athogens).

Repat genes encode relatively small proteins of a molecular weight of approximately 15 kDa and their expression is restricted to the midgut cells (Hernandez-Rodriguez, *et al.*, 2009, Herrero, *et al.*, 2007). Initially we identified four members of this family in *S. exigua*. However, in a recent study comparing the gene expression

profiles of *B. thuringiensis*-resistant and susceptible colonies, we identified three novel members of the *repat* family (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010). Interestingly four *repat* genes were constitutively higher expressed in the resistant insects supporting the role of these genes in the response to *B. thuringiensis*. Furthermore, for the *repat5* gene, the increase in expression was positively correlated with the resistance level (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010).

The aim of the present study was to increase our knowledge about this gene family and its possible role in the response to pathogens by identifying the midgut proteins that could interact with one member of the family, REPAT1. Using the yeast two-hybrid technology we have detected the interaction of REPAT1 with other members of the same family, leading to the discovery of a new member: REPAT8. This was further confirmed by observation of the change in REPAT1 subcellular localization in the presence of REPAT8, in insect cells. Finally, changes in the expression of eight *repat* genes after larval exposure to different treatments, as well as in normal insect rearing conditions, were studied.

4.2 Materials and methods

Insect rearing

S. exigua larvae (FRA colony) were continuously reared on artificial diet at 25±3 °C with 70±5% RH and a 16:8 h photoperiod (light:dark). This colony had been maintained for at least 10 years without exposure to *B. thuringiensis* (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2008).

Yeast two-hybrid screening

Yeast two-hybrid screening was used to determine REPAT1 putative interactors. For that purpose *repat1* gene was cloned into the Gateway System (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). *Repat1* specific primers with a linker for the directional insertion in the vector were designed (Forward: CAC CAT GAG GAG TTT AAT TAT CAT CGC; Reverse: CTG ACG ACG AAA CAG TTC AAT GG) and the *repat1* Open Reading Frame (ORF) was amplified and ligated into the pENTR/D-TOPO vector (Invitrogen). Clones were verified by sequencing and, afterwards, *repat1* ORF was recombined into the pDBGAL4 bait vector (pDEST™32, Invitrogen) using LR Clonase II (Invitrogen) and the resulting plasmid pRepat1DBD was transformed into the PJ69-4α yeast strain. REPAT1 protein was checked for autoactivation of the yeast

reporter genes using the *HIS3* selectable marker in the absence of the GAL4 activation domain (Honma and Goto, 2001).

For the screening of putative REPAT1-interacting proteins, a *S. exigua* larval midgut cDNA library was produced. Fourth instar larvae were exposed for 24 hours to a sublethal concentration of Xentari™, a *B. thuringiensis*-based biopesticide (Valent Bioscience Co., Libertyville), using the diet surface contamination method (Hernandez-Martinez *et al.*, 2008). Larvae showing consumption of diet during the feeding period were dissected and their midguts were pooled for RNA extraction. Total RNA was isolated using the Trizol reagent (Invitrogen) and mRNA was purified using the Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA). Purified mRNA was employed for the construction of the cDNA library using the CloneMiner cDNA library construction Kit (Invitrogen). The cDNA fragments from the library were recombined into the pADGAL4 prey vector (pDEST™22, Invitrogen) using LR Clonase II (Invitrogen) to generate the prey library. Plasmid DNA from the prey library was transformed into a yeast strain already containing the pRepat1DBD plasmid using the large scale LiAc (Gietz and Woods, 2002) for the screening for REPAT1-interacting proteins. Yeast colonies that were able to grow on SD medium in the absence of Leu, Trp, and His amino acids were selected as positive clones. Plasmids from these positive clones were isolated from the yeast, and transformed into *E. coli* (DH10β) cells for amplification and sequencing using standard flanking primers.

Sequences were assembled using the Seqman program (Lasergene package, DNASTar, Madison). Alignment and phylogenetic tree construction with the deduced amino acid sequences of the REPAT proteins was performed using the ClustalX program (Thompson, *et al.*, 1997). Phylogenetic reconstruction was obtained by the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) together with bootstrap analysis using 1000 replicates. Kimura correction for multiple substitutions was applied (Kimura, 1980).

Plasmid constructions and fluorescence microscopy

In order to determine the cellular localization of REPAT1 and REPAT8, fusion proteins were made with GFP and DsRED, respectively. Primers containing 5' BamHI and 3' EcoRI restriction sites were designed for the directional PCR cloning of complete *repat1* ORF (Forward: 5' GAG GAT CCG CGA AGA TGA GGA GTT TAA TTA TC; Reverse: 5' GGA ATT CGC TGC CGT CTG AAT AAT TCA ATA G) into the p166BRNX-AcV5 (Ijkel *et al.*, 2000) vector to obtain REPAT1-GFP fusion. Similarly, for the REPAT8-DsRED fusion, primers containing 5' *XhoI* and 3' *HindIII* restriction sites were designed for cloning of *repat8* ORF (Forward: 5' CTC GAG ATG AGG AGC TTC

ATG ATC; Reverse: 5' AAG CTT GTT GTA TGA CCT CCT GTA T) into the pDsRed-Monomer-N1 vector (Clontech Laboratories Inc, Mountain View). The resulting plasmids were named pRepat1GFP and pRepat8DsRED, respectively. The empty vectors (expressing only GFP or DsRED, respectively) were used as controls in the different combinations and were named pGFP and pDsRED, respectively.

Sf21 cells used in the localization experiments were maintained in Grace's medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 0.5% penicillin/streptomycin at 27 °C. Cells were grown on glass cover slides and after their attachment, the medium was replaced with serum- and antibiotic-free medium. Cells were transfected with 3 µg of each plasmid DNA and *Insect GeneJuice*[®] Transfection Reagent (Novagen), according to the manufacturer's instructions. After incubation for 8-10 hours, the transfection mixture was replaced with Grace's medium (Invitrogen) supplemented with 10% FBS and 0.5% penicillin/streptomycin. Between 48 and 72 hours post transfection, cells were mounted in Fluorescent Mounting Media (Dako, Glostrup) and observed using confocal microscopy (Leica TCS SPE). Due to reduced efficiency of co-transfection, experiments were repeated at least 10 times for each combination of vectors.

Microbial toxins and bacterial treatments

Cry1Ca was expressed as protoxin in *E. coli* (XL-1 blue), extracted, solubilized and trypsin-treated as described previously (Herrero, *et al.*, 2004). Two days before treatments, *B. thuringiensis cry-* (*subsp. israelensis*, 4Q7 strain), *E. coli* (DH10B) and *Enterococcus sp.* (isolated from *S. exigua* midguts; Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010) were cultured overnight in 250 ml Luria-Bertani medium (LB) at 29 °C (*B. thuringiensis*) or 37 °C (*E. coli* and *Enterococcus sp.*). Cells were collected by centrifugation and stored at 4 °C before treatments.

S. exigua larvae were reared on a diet in which the standard antibiotic (tetracycline, 500 µg/ml) had been replaced by streptomycin (200 µg/ml) in order to eliminate the midgut microbiota present in our colony. Previous observations in the laboratory had shown that midgut microbiota was resistant to tetracycline but not to streptomycin (Hernandez-Martinez *et al.*, 2010). For each treatment, early 5th instar (microbiota-free) larvae were exposed for 8 hours to the different treatments: 2 µg/cm² Cry1Ca toxin, 1825 µg/cm² Xentari[™] and 10⁹ CFUs/cm² bacteria (*Bt cry-*, *E. coli* and *Enterococcus sp.*) using the diet surface contamination method as well as non-exposed sample to use as reference. To test the microbiota influence on the expression of *repat* genes, a sample of larvae was reared on the standard diet (with

tetracycline but not streptomycin) and non-exposed to any treatment. Larvae showing consumption of diet during the feeding period were dissected and their midguts were pooled for RNA extraction. Each treatment was done twice and at least 5 midguts were dissected per sample.

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Midgut RNA was isolated using RNazol (MRC Inc., Cincinnati, OH) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (0.5 µg) was reverse transcribed into cDNA using oligo-dT primers and SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen). RT-qPCR was carried out using SYBR Green (Applied Biosystems) following standard protocols and measured in ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Expression levels were normalized using the expression levels of a non-differentially expressed *ATP synthase subunit C* gene using the formula $(Ct_{\text{repat, exposed}} - Ct_{\text{ATPsynthase, exposed}}) - (Ct_{\text{repat, control diet}} - Ct_{\text{ATPsynthase, control diet}})$. Expression fold changes for each gene are relative to the control treatment (non-exposed larvae reared with streptomycin in diet). Differences in relative expression were checked using Relative Expression Software tool (REST) based in pair wise fixed reallocation randomization test (Pfaffl, 2001).

Specific primers were designed using the software program Primer Express (Applied Biosystems) for *repat8* (Forward: 5' GCA CTC GCA GCC TGC TAT G; Reverse: 5' CGT CGA ATA CTA TGA CTT GAG ACA TCT) and new primers for *repat4* (Forward: 5' TGA CAA TGC CGC GAT AAT GAT G; Reverse: 5' GTA CAG CCG CAT CAT AGC AAG). Primers for *repat1*, *repat2*, *repat3* and *ATP synthase subunit C* amplification were previously described in Herrero *et al.*, 2007 and primers for *repat5*, *repat6* and *repat7* in Hernández-Martínez *et al.*, 2010. A simultaneous expression analysis of 8 *repat* was performed using the GraphPad Prism program (GraphPad software Inc., San Diego). Hierarchical Clustering (HCL) analysis of expression data was carried out using Cluster 3.0 software (Eisen, *et al.*, 1998). The parameter setting for clustering analysis was based on the Euclidean distance and the average linkage method. TreeView software (Saldanha, 2004) was used to display the heat map of clustering results.

4.3 Results

Identification of REPAT1-interacting proteins

We used yeast two-hybrid technology for the screening of midgut proteins that could interact with REPAT1. After checking that pRepat1DBD does not contain an activation domain active in yeast, a cDNA expression library fused to the GAL4 activation domain was transformed in the yeast strain which contained pRepat1DBD. A total of 6×10^7 transformants were screened for their ability to grow on a medium lacking histidine. This screening yielded 28 colonies, of which cDNA from putative REPAT1-interacting proteins were subsequently sequenced. Three different types of cDNA sequences were identified: 3 had homology to *cytochrome oxidase* (GenBank Accession No. EU812751), 10 were identical to the *repat4* gene (GenBank Accession No. EF153743) and 15 had homology, but were not identical, to the *repat7* sequence (GenBank Accession No. FJ595236). The sequences with homology to *cytochrome oxidase* were not considered for further studies due to well-known presence of these proteins as false positives in yeast two-hybrid experiments (Hengen, 1997). In brief, yeast two-hybrid screening showed interaction of REPAT1 with two other proteins of the REPAT family, identifying REPAT4 and a new REPAT7-like protein as REPAT1-interacting proteins.

The cDNA encoding the REPAT7-like protein which interacts with REPAT1 was fully sequenced and a new *repat* member was identified: *repat8* (GenBank Accession No. JN166083). The *repat8* cDNAs encoded a hypothetical protein of 137 amino acids (Fig 2.1A). The predicted protein sequence was aligned with that of other REPAT proteins using the ClustalX program (Thompson, *et al.*, 1997) revealing, as occurred with previously described REPATs, the presence of a hypothetical signal peptide at the N-terminal conserved region and a di-leucine motif at the amino acidic position 60 (Fig 2.1A). Phylogenetic reconstruction by Neighbour Joining (Fig 2.1B) revealed the clustering of the new REPAT8 together with REPAT7.

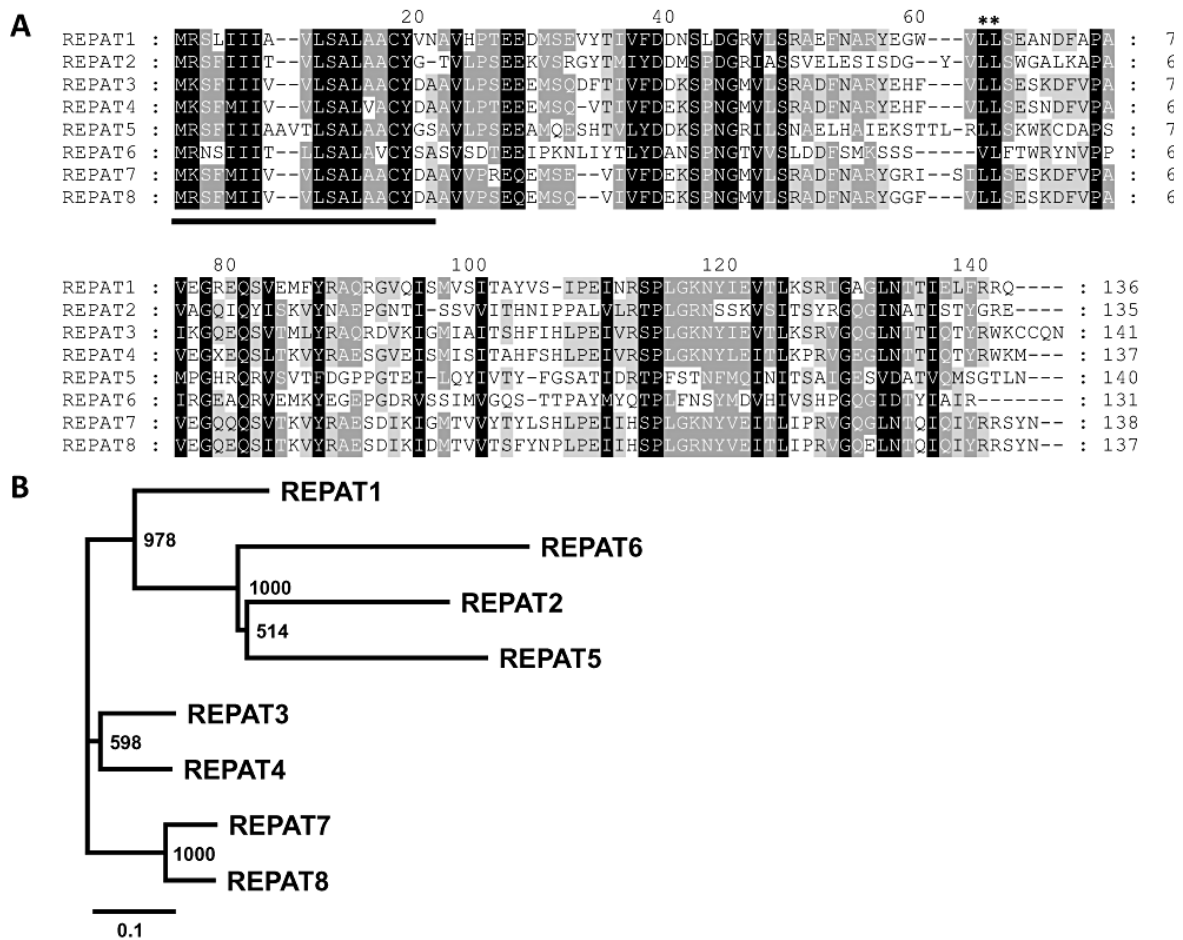


Figure 2.1. Comparison of REPAT protein sequences. (A) ClustalX alignment of the deduced amino acid sequences from REPAT proteins in *Spodoptera exigua*. Asterisks denote the di-leucine motif and underlined sequences correspond to the predicted signal peptide. (B) Phylogenetic tree derived from the ClustalX alignment by the neighbor-joining method.

Cellular localization of REPAT1 and REPAT8

Functional interaction between REPAT proteins requires both proteins to be located in the same cellular compartment. Thus, we decided to determine the cellular localization for the REPAT1 and REPAT8 proteins in insect cells. For this purpose, REPAT1 and REPAT8 proteins were fused to GFP and DsRED, respectively. Moreover, GFP and DsRED proteins alone were used as negative controls. When insect Sf21 cells were co-transfected with plasmids expressing the REPAT1-GFP protein (pRepat1GFP) and the control pDsRED, the GFP fluorescence was restricted to the cytoplasm of the cell with an irregular distribution (Fig 2.2, left panels), and fluorescence was excluded from the nucleus. This result indicates a cytoplasmic localization of the REPAT1 protein. Sf21 cells were also co-transfected with plasmids expressing the REPAT8-DsRED (pRepat8DsRED) and the control pGFP. In this case,

we observed ubiquitous and homogenous distribution of both colors (Fig 2.2, central panels), suggesting the presence of REPAT8 in the cytoplasm as well as in the nucleus. Moreover, no differences in the distribution of red signal was observed between cells expressing REPAT8-DsRED or DsRED, confirming that fusion of DsRED to REPAT8 is not interfering with its cellular localization. Interestingly, when Sf21 cells were transfected simultaneously with both REPAT-containing plasmids (pRepat1GFP and pRepat8DsRED) GFP signal was found homogeneously distributed in the cell (Fig 2.2, right panels). The same pattern of REPAT1 localization was observed for more than 10 independent co-transfection experiments (Fig 2.3) discarding that occurrence of experimental artifacts. These results suggest that the presence of REPAT8, besides promoting the homogeneous distribution of REPAT1 in the cytoplasm, drives its migration into the nucleus, supporting the physical interaction between both proteins.

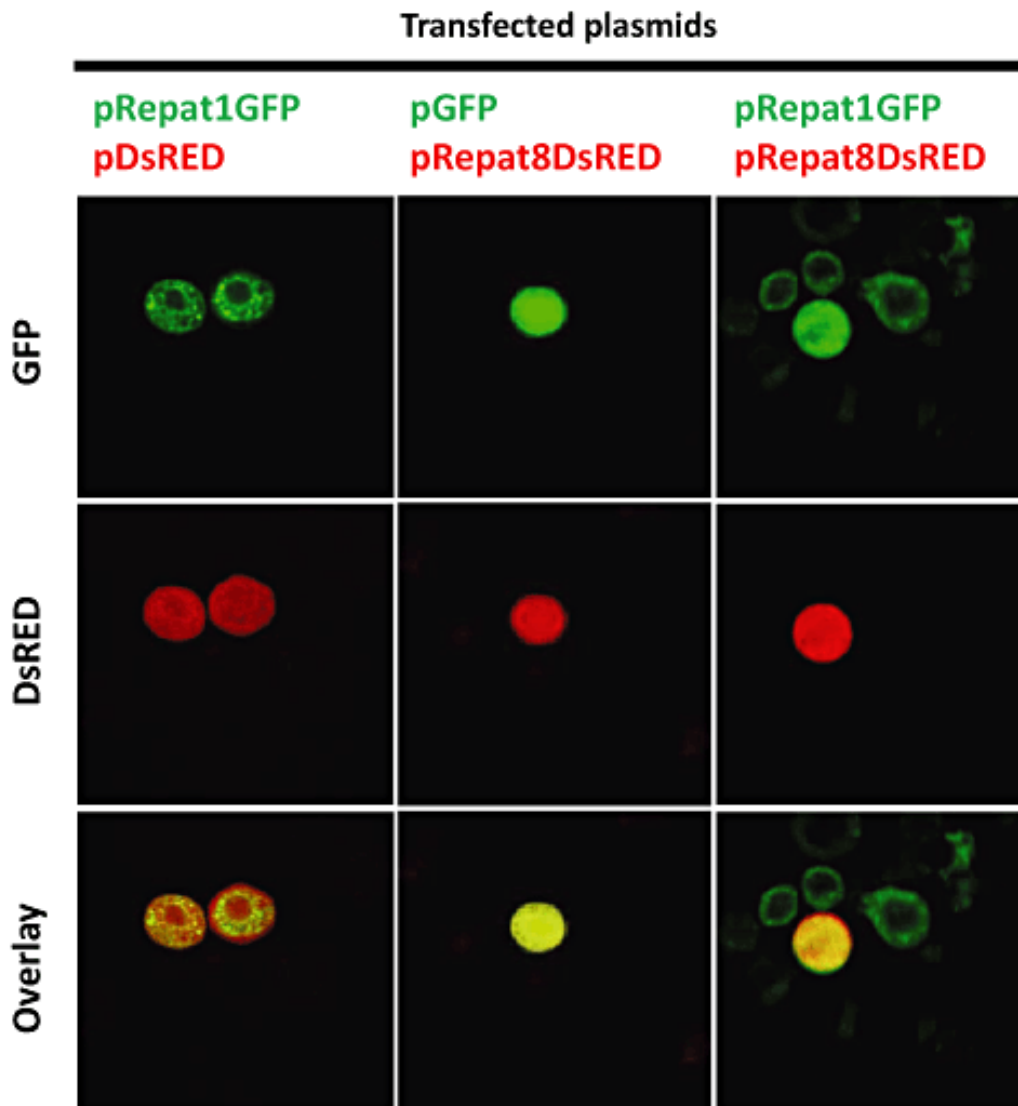


Figure 2.2. Subcellular localization of REPAT1 and REPAT8. Sf21 cells were co-transfected using 3 different combinations of reporter plasmids: left panels, pRepat1GFP and pDsRED, middle panels, pGFP and pRepat8DsRED, and right panels, pRepat1GFP and pRepat8DsRED. Fluorescence was visualized by confocal microscopy 48 to 72 hours post transfection.

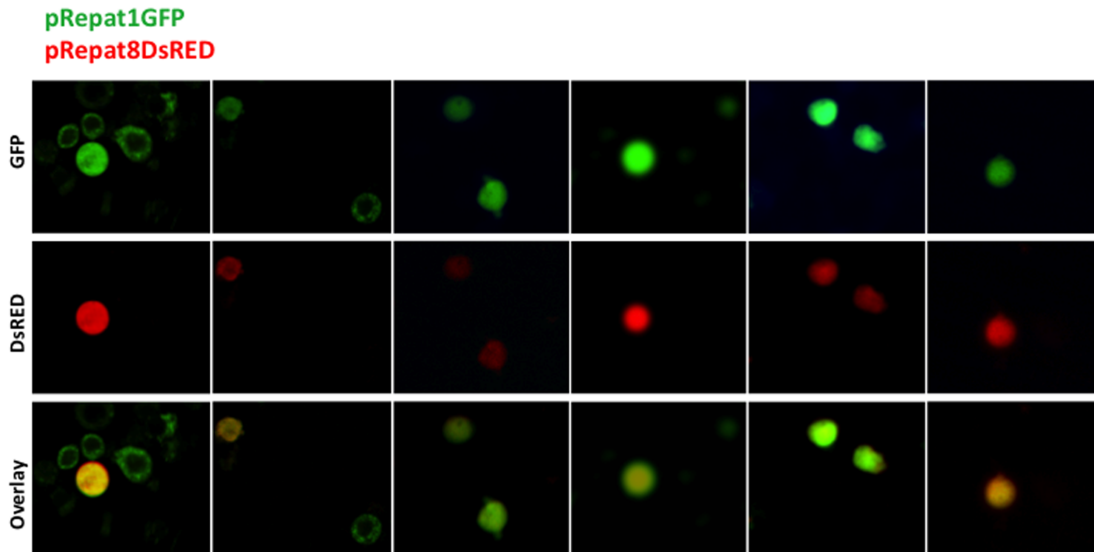


Figure 2.3. Subcellular localization of REPAT1 in presence of REPAT8. Sf21 cells were co-transfected with pREPAT1GFP and pREPAT8DsRED and fluorescence was visualized by confocal microscopy 48 to 72 hours post transfection. Each picture is representative from independent transfection experiments.

Expression profile of *repat* genes in response to pathogens

With the aim of determining if *repat* genes identified so far responded to *B. thuringiensis* or to other bacterial pathogens, fifth instar larvae were fed for 8 hours with the Cry1Ca toxin from *B. thuringiensis*, Xentari™ (a *B. thuringiensis*-based product producing several insecticidal toxins), a plasmid-cured strain of *B. thuringiensis* (Bt cry-) that does not produce Cry toxins although it seems to produce Vip3A toxin and other virulence factors (Franco-Rivera, *et al.*, 2004), *E. coli*, or the *Enterococcus* sp strain. In parallel, to determine the effect of midgut microbiota on the expression of *repat* genes we also included a group of larvae reared in the absence of streptomycin in the diet.

Simultaneous analysis of the results for the eight *repat* genes showed two general trends for the different treatments and genes (Fig 2.4A and 2.4B). In general, treatment with Cry1Ca toxin, Xentari™, and Bt cry- induced the up-regulation of *repat* genes (Dunnett's Test; $P < 0.05$). In contrast, no significant effect was detected after treatment with *E. coli* or *Enterococcus* sp. (Dunnett's Test; $P > 0.05$). Similarly, the presence of midgut microbiota had no effect on the expression of *repat* genes (Dunnett's Test; $P > 0.05$).

Focusing on specific genes, a mixed pattern of effects on expression was observed (Fig 2.4). *Repat1* was significantly up-regulated only in the Cry1Ca exposed insects and down-regulated in the presence of the microbiota in the midgut. *Repat2* showed the highest levels of expression (>100-fold) with the Cry1Ca and Xentari™ treatment, the only two treatments containing Cry proteins, however, no significant

Chapter 2:

Functional interactions between members of the REPAT family of insect pathogen-induced proteins

change of expression was found for the other treatments. *Repat3* was only significantly up-regulated for the Xentari™ treatment. *Repat4* was found up-regulated only for the Bt cry-, and *Enterococcus sp.* treatment, both gram-positive bacteria. *Repat5* was found up-regulated with all the *B. thuringiensis* related treatments (Cry1Ca, Xentari™, and Bt cry-) but not for the rest of treatments. *Repat6-8* showed a similar pattern of expression (Fig 2.4A and 2.4B) for all the treatments being significantly up-regulated only after Cry1Ca treatment.

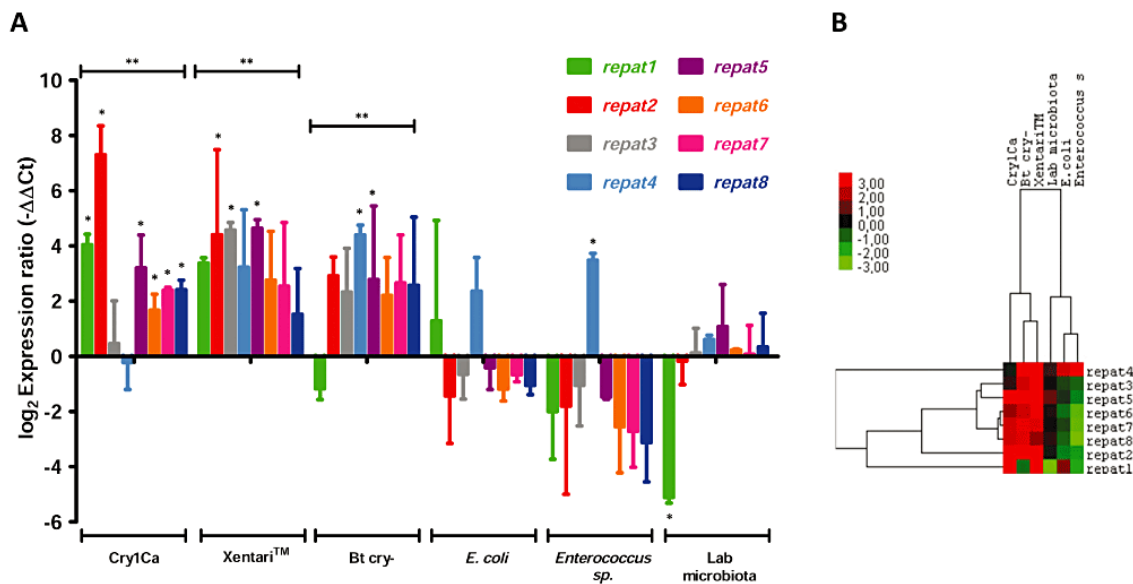


Figure 2.4. Expression of *repat* genes in *S. exigua* larvae. (A) Changes in expression of *repat* genes after exposure to Cry1Ca toxin, pathogenic bacteria (Xentari™ and Bt cry-), and non-pathogenic bacteria (*E. coli*, *Enterococcus sp.*, and microbiota) in the midgut of fifth instar larvae of *S. exigua*. The results are the means \pm standard deviation of two independent infection experiments. Single asterisks indicate changes in expression that are significantly different from expression in the control larvae (REST test, $P < 0.05$). Double asterisks on a treatment denote that it has a significant general effect in the global expression of *repat* genes (Dunnnett's test, $P < 0.05$). (B) Clustering of the *repat* genes based on the similar response to the different treatments.

In order to check if the pattern similarity in the expression of *repat* genes correlated with similarities in the amino acid sequences we subjected the expression values to a clustering analysis (Fig 2.4B). Except for the similar expression regulation of REPAT7 and REPAT8, no agreement was found between the phylogenetic tree (Fig 2.1B) and the tree obtained from expression values (Fig 2.4B). Moreover, REPAT4 and REPAT8, which have been both found to interact with REPAT1, did not respond similarly to different pathogen challenges, suggesting a different role for each combination of REPAT proteins.

4.4 Discussion

The first *repat* genes (*repat1* to 4) were identified due to their higher expression in *S. exigua* midguts in response to Cry1Ca and Cry1A toxin intoxication as well as to baculovirus infection (Herrero, *et al.*, 2007). More recently, three new members (*repat* 5 to 7) of the family were found to be highly expressed in a colony of *S. exigua* that had developed resistance to the *B. thuringiensis*-based product Xentari™ (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010). In the present work a new *repat* gene was found, increasing the number of *repat* family members to eight. Moreover, 454-based sequencing of the larval transcriptome of *S. exigua* (Pascual *et al.*, 2012) has revealed that this family could involve more than 20 members. We have also tried to identify *repat* genes in other insect species. So far, we have only found proteins with homology to REPAT in closely related species of the Noctuidae family. Several members of the REPAT family have been found as ESTs from the midgut of *S. frugiperda* larvae exposed to natural products and xenobiotics (Negre, *et al.*, 2006) or to the Cry1C toxin (Rodriguez-Cabrera *et al.*, 2008). Similarly, a few homologs have also been found in an EST library obtained from the midgut of 5th to 6th instar molting *Spodoptera litura* larvae (NCBI identifier LIBEST_026064). More recently, several homologs have also been found in *Mamestra configurata*. The lack of known homologs in more distant *Lepidoptera* species may be either due to the sequence dissimilarity as a result of to the evolutionary divergence among *Lepidoptera* families or to the unique occurrence of this gene family in Noctuidae.

Aiming to increase our knowledge about possible functions of REPAT proteins we have identified midgut proteins that are able to interact with REPAT1. Interestingly, yeast two-hybrid studies have revealed the interaction of REPAT1 with other proteins belonging to the same family: REPAT4 and REPAT8. Moreover, we have confirmed the presence of the other *repat* members (REPAT1, 2, 3, 5, 6, and 7) in the library used for the yeast two-hybrid screening (data not shown), indicating that the interaction occurring between REPAT1 and other REPAT proteins is restricted to a few combinations. Among the eight known members of the REPAT family no obvious primary sequence features were found that distinguish the REPAT1-interacting proteins from those that do not interact. In addition to that, the expression pattern of *repat4* and *repat8* genes in insects exposed to different treatments did not reveal a common behavior. These results suggest that the function of REPAT1 is mediated by the formation of specific combinations with REPAT4 and REPAT8.

Different REPAT proteins may not only differ in their expression pattern but also in their subcellular localization. REPAT1 had an irregular distribution along the cellular

cytoplasm while REPAT8 was homogeneously distributed throughout the whole cell. However, when both proteins were present in the same cell we observed the translocation of REPAT1 into the nucleus, confirming the functional interaction between the proteins. Moreover, additional to the nuclear translocation, the irregular distribution of REPAT1 in the cytoplasm become homogeneous suggesting that the absence of REPAT1 in the nucleus when REPAT8 is not present could be due to the organellar localization of REPAT1. The presence of a signal peptide has been predicted for all the REPAT proteins (Fig 2.1A) however, previous expression of REPAT1 in insect cells using the baculovirus expression system (Herrero, *et al.*, 2007) indicated that the protein was not secreted into the medium, suggesting its possible targeting to certain cellular organelles. Analysis of the protein sequence using PSORT software (Yu, *et al.*, 2010) revealed the presence of a di-leucine motif at the amino acid position 60 of REPAT1 predicting the lysosomal targeting of the protein. However, this motif appears conserved in the 8 REPAT proteins, including REPAT8, which shows a homogeneous distribution in the cell. Nuclear translocation has been described as a standard mechanism to regulate the activity of certain proteins (Nakielny and Dreyfuss, 1999) and moreover, formation of protein complexes between different proteins of the same family has been described for the action of many transcription factors (Mowen, *et al.*, 1998). Thus, in the absence of additional evidence about the molecular role of these proteins, it is tempting to speculate that REPAT proteins could act as transcription (co-) factors. Nevertheless, additional experiments are required to confirm such hypothesis.

Expression analysis of *repat* genes in insects exposed to a pore-forming toxin (Cry1Ca), pathogenic bacteria (XentariTM and Bt cry-), and non-pathogenic bacteria (*E. coli*, *Enterococcus sp*, and microbiota) resulted in two main observations. First, general up-regulation of *repat* gene expression was only significant for those treatments producing certain damage to the larval midgut (Fig 2.4), suggesting that *repat* up-regulation not only occurs by the presence of active Cry toxins (also present in XentariTM) but also when insects are exposed to the vegetative forms of the Bt cry-, which apparently expresses the Vip3A toxin (Franco-Rivera, *et al.*, 2004), and other *B. thuringiensis* virulence factors. Thus, up-regulation of *repat* gene expression seems to be a response to cellular damage but not to the presence of bacteria in the midgut as occurs with several other pathogen-related proteins (Beckage, 2008). Second, expression of *repat* genes was very variable among the different treatments but also among the biological replicates. We were extremely careful on the reproducibility of the treatments, paying special attention to using identical rearing conditions and highly synchronized larvae for all the treatments and replicates. Therefore, the high variability

could reflect the involvement of *repat* genes in several aspects of insect physiology that we are still unable to control.

In summary, we have found that some REPAT proteins are able to interact with each other and that such interaction may have a functional role based on their change in subcellular localization. This has led to the finding of a novel member of the REPAT family. The analysis of the expression pattern of eight REPAT members has shown that they have a variable response to different conditions and treatments. All these data together suggest that REPAT proteins may play a role in many different processes related with midgut physiology and probably these different processes are mediated by the functional combination of different REPAT proteins. Further experiments aimed at studying the different REPAT proteins in different insect species and determining the interaction among them will hopefully shed light on the role of these proteins in the midgut physiology.

CHAPTER 3:

A new gene superfamily of pathogen-response (*repat*) genes, classification and expression analysis

These results are included in:

Navarro-Cerrillo G, Hernandez-Martínez P, Vogel H, Ferre J, and Herrero S. A new gene superfamily of pathogen-response (*repat*) genes, classification and expression analysis. Submitted to: Insect Biochemistry and Molecular Biology.

5.1 Introduction

The insect larval gut is in continuous contact with microorganisms (endogenous microbiota as well as pathogenic) and their virulence factors. For this reason, the larval gut has developed several mechanisms to detect these potentially harmful microorganisms and block their action. So far, several defense mechanisms have been described for the insect gut. These defense response mechanisms include, among others, secretion of lysozymes, local production of antimicrobial peptides (Cheng, *et al.*, 2006, Freitak, *et al.*, 2007), synthesis of reactive oxygen species (Buchon, *et al.*, 2009), cell phagocytosis (Rivkin, *et al.*, 2006), cellular apoptosis (Blissard, *et al.*, 1996), cell sloughing (Washburn, *et al.*, 2003) and the activation of repair systems (Li, *et al.*, 2006, Loeb, *et al.*, 2001). Recent studies in *Drosophila melanogaster* (Diptera) adults have shown that epithelial renewal is not only activated in response to pathogenic bacteria but also by the presence of indigenous microbiota (Buchon, *et al.*, 2009). However, to our knowledge, no data about the activation of the epithelial renewal in *D. melanogaster* larvae has ever been reported.

The entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* is commonly used for insect pest control of different Lepidoptera, Coleoptera and Diptera species. *B. thuringiensis* produces toxins and other virulence factors that, after their entrance in the larval midgut, are responsible for insect intoxication and eventual death (de Maagd, *et al.*, 2001). The main virulence factors produced by *B. thuringiensis* are crystal toxins (Cry) that are pore-forming toxins and bind to specific receptors in the microvilli of midgut epithelial cells. Although the mode of action of Cry toxins is relatively well known (Soberon, *et al.*, 2010), little information is available about the insect mechanisms involved in the response to this entomopathogenic bacteria or its Cry proteins. Transcriptional studies in *Choristoneura fumiferana* and *Manduca sexta* have shown the regulation of metabolic and stress-related genes after exposure to sublethal doses of Cry1Ab toxin (Meunier, *et al.*, 2006, van Munster, *et al.*, 2007). Also the involvement of the *mitogen-activated protein kinase p38* in the response to Cry toxins in different insect orders has been described (Cancino-Rodezno, *et al.*, 2010). In our laboratory, working with the Lepidoptera *Spodoptera exigua*, we have identified a group of proteins whose expression responds to Cry toxin intoxication. Some of these proteins, known as REPAT (**r**esponse to **p**athogen) proteins were found to be up-regulated in response to not only Cry toxins, but also to *B. thuringiensis* and other microbial pathogens (Herrero, *et al.*, 2007).

Further studies on *S. exigua* identified novel members of the *repat* gene family and showed higher expression of some members in a *B. thuringiensis*-resistant colony in comparison with a susceptible colony (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010). This study also revealed a positive correlation between the expression levels of *repat5* and the resistance to the *B. thuringiensis*-based product, Xentari™. More recently, and trying to determine the molecular role of the REPAT proteins in the response to pathogens, we found that the REPAT1 protein is able to physically interact with other members of the REPAT family and translocate into the cellular nucleus (Navarro-Cerrillo, *et al.*, 2012). These results suggest that REPAT proteins could act as transcriptional regulators in the insect midgut cells.

Before this work was started, eight different *repat* genes had been described, all of them hypothetically encoding for relatively small proteins (less than 20 kDa) and their expression was restricted to the midgut cells (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010, Hernandez-Rodriguez, *et al.*, 2009, Herrero, *et al.*, 2007, Navarro-Cerrillo, *et al.*, 2012). This family of genes was found exclusively in *Spodoptera spp.* And they lacked clear homologs in other insect species. In the present study, we have mined the 454-based transcriptome of *S. exigua* larvae (Pascual *et al.*, 2012) and other insect databases in order to find new *repat* sequences. We have identified more than 40 new members of the *repat* family in *S. exigua* that have allowed the identification of *repat* homologs in other *Spodoptera spp.* And also in less related species. Additional experiments have reflected their high diversity, not only at the sequence level but also in their response to the intoxication with the Cry1Ca toxin and to the increase in the midgut microbiota.

5.2 Materials and Methods

Insect rearing

S. exigua larvae (FRA colony) were continuously reared on artificial diet at 25±3 °C with 70±5% RH and a 16:8 h photoperiod (light:dark). This colony had been maintained for at least 10 years without exposure to pathogens (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2008).

Data mining for *repat* and *repat*-like sequences

S. exigua larvae transcriptome (Pascual *et al.*, 2012) was screened for unique assembled sequences (unigenes) with homology to *repat* genes. The protein sequences of previously described REPAT1 to REPAT8 (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010, Herrero, *et al.*, 2007, Navarro-Cerrillo, *et al.*, 2012) used as query to perform TBLASTN searches against the *S. exigua* larval transcriptome and the obtained hits

were used in a new TBLASTN searches against the same database. Sequences obtained from the BLAST search were aligned using ClustalX (Larkin, *et al.*, 2007) and filtered in order to remove short sequences as well as allelic variants from the same gene. As standard criteria, a new *repat* was considered as a new gene when the predicted sequence had less than 95% of amino acid identity with another REPAT protein.

For the identification of *repat* sequences in other *Spodoptera spp.*, a preliminary phylogenetic tree was performed with all the REPAT proteins from *S. exigua*, revealing the presence of three main branches. One REPAT member representative of each of the main branches was used as query to perform TBLASTN searches (Altschul, *et al.*, 1997) against the NCBI databases (nr and EST). Obtained hits were filtered using the same criteria than above. We also included in our study members from another closely related species, *Mamestra configurata*, for which REPAT proteins had already been described (Table 3.2). Moreover, sequences from two in-house databases of *Spodoptera littoralis* and *Mamestra brassicae* with homology to REPAT proteins were also included. BLASTP was also performed against the nr-protein database at NCBI in order to detect proteins with homology to REPAT in more distantly related species using different REPAT proteins as query. For the sake of clarity, only few of the obtained hits were selected in order to include a *Drosophila melanogaster* homolog (DmCG13323) as well as proteins from other lepidopteran species that have been previously characterized (HaHMG176 and BmMBF2). Table 3.2 summarizes the proteins used in the phylogenetic and MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) analysis.

Phylogenetic and MEME motif analysis

Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA5 software (Tamura, *et al.*, 2011). Protein sequences were aligned using CLUSTALW (Larkin, *et al.*, 2007). The obtained alignment was used to infer the Neighbor-Joining (NJ) phylogenetic tree (Saitou and Nei, 1987) together with bootstrap analysis using 1000 replicates. Conserved motifs in REPAT protein sequences were identified using motif based sequence analysis tool, MEME Suite version 4.6.1 (Bailey, *et al.*, 1994) (http://meme.nbcr.net/meme4_6_1/cgi-bin/meme.cgi), with the following parameters: optimum width 6–200 amino acid, any number of repetitions of a motif and maximum number of motifs set to 10.

Insect treatments

Larvae from *S. exigua* were used under three different conditions or treatments: non-exposed, Cry1Ca exposed and Lab-microbiota. For testing the effect of midgut microbiota, larvae were reared in the presence of streptomycin in the diet (labeled as non-exposed). These larvae showed a reduction in 5000-fold times in the number of midgut bacteria, so insects reared under standard conditions but in the absence of streptomycin in the diet had the normal laboratory microbiota and were labeled as Lab-microbiota treatment. For Cry1Ca-exposed larvae, insects were reared as non-exposed larvae but 8 hours before dissection they were fed with surface-contaminated diet (2000 ng/cm² of Cry1Ca toxin) (Herrero, *et al.*, 2007). Gene expression analysis was performed with synchronized 5th instar larvae that were reared simultaneously. For this purpose, synchronized larvae were individualized in new antibiotic-free diet (with Cry1Ca toxin in the case of Cry1Ca-treated larvae). Eight hours later, larvae actively eating were selected and their midguts were dissected. For each treatment and replicate at least 5 midguts were obtained and pooled for RNA extraction.

The Cry1Ca toxin used for the exposure experiments was obtained from a recombinant *Escherichia coli* expressing the Cry1Ca protoxin. Cry1Ca was extracted, solubilized and trypsin treated as described previously (Herrero, *et al.*, 2004). Trypsin-activated Cry1Ca was dialyzed overnight against 50 mM sodium bicarbonate pH 9.0, 150 mM sodium chloride and kept at -20 °C until used.

Isolation of midgut tissues and midgut stem cells

Isolation of midgut stem cells was performed as previously described in Cermenati *et al.*, (2007). Briefly, 20 *S. exigua* early 5th instar larvae were used for each condition. Previously to the dissection, larvae were surface-sterilized by consecutive immersion (four minutes in each) in 10% (v/v) detergent (Pharma Soap Medical), 0.1% p-hydroxybenzoic acid methyl ester, and 0.1 % sodium hypochlorite. Larvae were cut between the second and the third pair of thoracic legs and behind the third pair of abdominal. Next, the cuticle of the ventral side was longitudinally cut, and the midgut was isolated from the larvae. Then, the midgut was deprived of the peritrophic membrane along with the enclosed gut contents. Dissected midguts were rinsed two times (10 minutes each) in sterile modified Insect Physiological Solution (IPS) (47 mM KCl, 20.5 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 4.3 mM K₂HPO₄, 1.1 mM KH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 88 mM sucrose, pH 7) with 0.003‰ (vol/vol) sodium hypochlorite and then two times (10 minutes each) in the same solution without sodium hypochlorite. For the stem cell preparation, midguts were pooled in a strainer (70 µm pore size), placed in a petri dish

containing a few millilitres of IPS, and left under mild agitation for 1 hour. The tissue in the strainer was discarded, and the free cells in the filtrate, mostly stem cells (Cermenati, 2007), were collected and pelleted by gentle centrifugation at 400g for 5 minutes. For each treatment and replicate, half of the midguts were treated as before but in the absence of strainer so the midguts and free cells were pelleted together by centrifugation.

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

RNA was isolated using TriPure (Roche) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (0.5 µg) was reverse transcribed into cDNA using an oligo-dT primer with SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen). RT-qPCR was carried out using SYBR Green (Applied Biosystems) following standard protocols and measured in ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Expression levels were normalized using the expression levels of a non-differentially expressed *ATPsynthase subunitC* gene using the formula $(Ct_{\text{repat, treatment}} - Ct_{\text{ATPsynthase, treatment}}) - (Ct_{\text{repat, control diet}} - Ct_{\text{ATPsynthase, control diet}})$ (Herrero, *et al.*, 2007).

Specific primers were determined using the Primique software (Fredslund, *et al.*, 2007) for the design of specific PCR primers for each *repat* gene (Table 3.1). Simultaneous expression analyses of *repat* gene expression (Dunnett's Test) as well as the *t*-test were performed using the GraphPad Prism program (GraphPad software Inc., San Diego). Hierarchical Clustering (HCL) analysis of expression data was carried out using Cluster 3.0 software (Eisen, *et al.*, 1998). The parameter setting for clustering analysis was based on the Euclidean distance and the average linkage method. TreeView software (Saldanha, 2004) was used to display the heat map of clustering results.

Determination of midgut cell proliferation rate

Midgut proliferation rate was estimated as the percentage of midgut cells testing positive for de novo synthesized DNA during 5 hours (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010). DNA synthesis was detected using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU; Click-iT™ Edu Imaging Kit, Invitrogen). Synchronized *S. exigua* 5th instar larvae were injected intrahemocoelically with 7.5 µl of 10% Phenol red solution in PBS containing 0.5 mM EdU. Three hours before injection, synchronized larvae were individualized in antibiotic-free diet as mentioned above. Midguts were dissected five hours after EdU injection. Midgut cells were dissociated by collagenase (type I; Sigma) treatment.

Chapter 3:***A new gene superfamily of pathogen-response (repat) genes, classification and expression analysis.***

Dissociated cells were fixed and stained for DNA synthesis (EdU) and nucleus (Hoechst 33342) following the manufacturer's protocol (Invitrogen). Cells were counted in a fluorescence microscope (DMI3000, Leica Microsystems, Wetzlar).

Table 3.1 Sequence primers used for RT-qPCR of *repat* genes.

Gene Name	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
<i>ATP synthase subunit C</i>	GTTGCTGGTCTGGTGGGATT	AGGCCTCAGACACCATTGAAA
<i>repat1</i>	GGGTTGGGTGCTGCTTTCT	GCTCTGCTCTTGGCCTTC
<i>repat2</i>	GGTCTATAATGCCGAGCCT	TACAAGTGCTGGAGGTATGTTG
<i>repat3</i>	ATTTTCGTGCCGGCGATTA	CGCGCTGGGCTCTATACAAAC
<i>repat4</i>	TGACAATGCCGCGATAATGATG	GTACAGCCGCATCATAGCAAG
<i>repat5</i>	AAGTGAAATGTGACGCTCCTT	CGGGAGGTCCATCAAAAGTC
<i>repat6</i>	CGGTTGTTCCCTGGATGAT	GGATGAAATGAGAAGTTATAGCGATCA
<i>repat7</i>	TTCGTGCCAACGGTTGAAG	TTTTGATGTCACTCTCAGCTCGAT
<i>repat8</i>	GCACTCGCAGCCTGCTATG	TGACAATGCCGCGATAATGATG
<i>repat9</i>	ACGGAATGGTTCTGTTTCAGAG	CTTCAACCGCTGGCAAGA
<i>repat10</i>	TCATCGTAGTGCTATCAGCA	GAGACATCTCCTCATCGCT
<i>repat11</i>	GAGCGAGGAGGAGATGTCTCA	CTGGACAGAACCATTCCGTTAG
<i>repat12</i>	CCGGCTGTGCAAGGCCAAGA	CCGCTGTCAGCTCGATACACCT
<i>repat13</i>	CAGTTGCAGGCCAAGTACAA	TAACACTTGATGCGCCTTGA
<i>repat14</i>	TGTCCAATGCGGAGGTTATT	GCCTACTGCTGGCGATG
<i>repat15</i>	CACAGCTGTCGACGGAACATA	ACCTGCCCACTACAGCTGAC
<i>repat16</i>	TTGAGCAGAGGCGAGTCTGA	TGACAATGCCGCGATAATGATG
<i>repat17</i>	TCGACAATCTATCCGCATGA	TTGCATACCAGTCTGAGAGG
<i>repat18</i>	ACAGTCTGGTGCAGCAATGA	TCCTAAACCGCGAATACCTG
<i>repat19</i>	ACGATGCATCAGTCCTGTCA	TCACCGTACACAATCGTTCC
<i>repat20</i>	GGAAGACGAGTAGAATGTGTGA	TTCACGAACACTGACTCCTT
<i>repat21</i>	CACACGTCTGGTACAAGA	ACCAATCCGACATTAGGTCTA
<i>repat22</i>	GGTTAGCCAGTCTGTTGGT	TTTAGGGCCAATCGGTGTAG
<i>repat23</i>	ACATGCAACTTGCCAGCTA	CAGGAAGAGCTAATCTGGATC
<i>repat24</i>	TGTTACGTGCCAGCTATACC	AAGAGCTAGTGTGATCCTAT
<i>repat25</i>	GTCTCCCGAATGATGAAGA	TCTTGCCTTCTGCTCCAAA
<i>repat26</i>	CATGCCATGATGCTGCTACT	CTATTCTGGGCAACGTCCTC
<i>repat27</i>	ACTGTCTTCAGAGGATTCGAC	TCAGTGCCAACGGACACT
<i>repat28</i>	CCAGTGTCTGTTGGTACTGAT	TCCACATCCTTCTTGACAGG
<i>repat29</i>	CATCATAGAGTATCCTGACAGG	TAGCCTTAATAGGCGTAGTTC
<i>repat30</i>	GCATCGTAGAGTATCCTGAAC	GCCTTAATATAGGCGTAGTTC
<i>repat31</i>	AAGGGCATCATAGCGAGAGA	ATGTTGGCGAAACTGAAACC
<i>repat32</i>	TTTCCGCTTGCTAACACTCA	CGACTGGTTAACTCGCCTTC
<i>repat33</i>	GTATCGGCTCATCCTTCGTC	ATGCCGTGTATGTTTCAGA
<i>repat34</i>	ATCGACAATCCGCCATCT	TTCACTACCTACACCAACACTT
<i>repat35</i>	CTGAAGAAGCAGCAGTGGGA	CATTGCAGACAGTGAGCAC
<i>repat36</i>	CTCTACCAGGGAGCCATCAG	TGTTAGGAACGGGGTTTTTg
<i>repat37</i>	TTGAGGAAGCAGCAGTGG	CAAGGATCAGGCTCTTCATCA
<i>repat38</i>	GGAACACCATAAGCAGCGT	GTACAAGTGCTGGAGGAATGC
<i>repat39</i>	AAGAGCCTGCTCCTCGTAGTAC	ATACTCGACGACCGCCTCAG
<i>repat40</i>	GCTTATCGTCAGCCAGGAC	GCTTCGTGCTATACAGGA
<i>repat41</i>	TCGTACGATGAGAACATC	CTCAACGCTTCTGCTACC
<i>repat42</i>	ATTGCTGGTGGACTTGGAGA	CTCTGCCAGACATAATTCGTAT
<i>repat43</i>	TGTCTAGGATCACACATAACGT	TGGTACTCTAATGGCTGTA
<i>repat44</i>	GAATGGCTTGAATGGCTTTT	GTGTATGATCGCCCAGCTTT
<i>repat45</i>	TTTTGTTGGTGGCAATAGCA	AACATGTTGGCTCCTTGCTC
<i>repat46</i>	CGTAATGTTGGCTGTTGTG	GCTTCCAAGATCAATCCAC

5.3 RESULTS

New members of the REPAT family

Prior to this work, eight *repat* genes from *S. exigua* had been identified in different studies in our laboratory. We recently used Next Generation Sequencing (NGS) to obtain a comprehensive transcriptome of *S. exigua* larvae exposed to different pathogens. A BLAST search for *repat* sequences in the *S. exigua* transcriptome identified 52 sequences with homology to the already described REPAT members. These 52 sequences included short sequences with homology to small fragments of *repat* genes; these sequences were discarded and not used for subsequent analyses. Only those sequences containing most of the REPAT ORF were selected. After sequence cleaning and analysis we ended up with 38 new *repat* genes. Thus, considering previous and new genes together, a total of 46 *repat* genes were identified in *S. exigua*. Phylogenetic analysis of the hypothetical 46 proteins from *S. exigua* and homologous proteins in other insect species (Fig 3.1) revealed that most of the proteins were distributed in two main groups that were subsequently classified as REPAT class α (α REPAT) and REPAT class β (β REPAT) proteins. The α REPAT class include the already described REPATs (REPAT1 to 8) and 18 new members (REPAT9 to 26). The β REPAT class contains 18 new members (REPAT29 to 46). Additionally, two other proteins with homology to REPAT (REPAT27 and REPAT28) did not cluster in any of the two main groups and are considered REPAT-like proteins.

Before this work, when only REPAT1 to 8 were known, we could only find homologs to REPAT proteins in closely related species of Lepidoptera such as *M. configurata*, *M. brassicae*, *S. frugiperda*, *S. littoralis*, and *S. litura* (Fig 3.1 and Table 3.2). With the identification of the novel REPAT members in *S. exigua*, we were able to identify proteins with homology to β REPAT in more distantly related species of insects. Homologs to β REPAT proteins in other Lepidoptera include several proteins that have been previously described and studied such as HMG176 from *H. armigera* (HaHMG176) and MBF2 from *B. mori* (BmMBF2). In a model organism such as *D. melanogaster* we have also found several proteins with homology to β REPATs, with CG13323 one of the most commonly found in the different BLAST searches. The phylogenetic tree shows that the REPAT proteins from distantly related species are only included in the β REPAT group (Fig 3.1) and that the α REPAT group is exclusive to REPAT proteins from *Spodoptera spp* and very closely related species such as *Mamestra spp*.

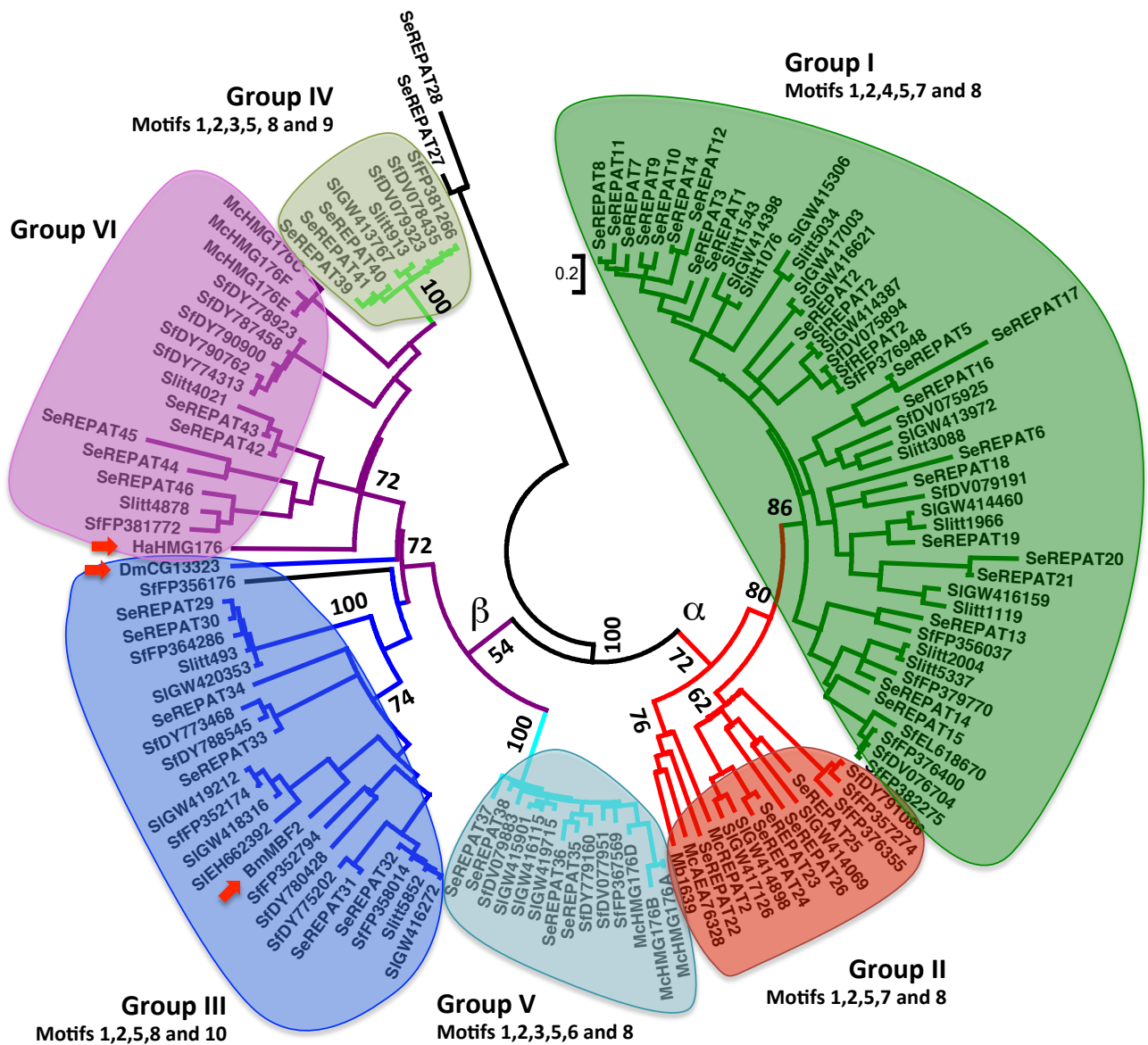


Figure 3.1. Phylogenetic analysis of REPAT proteins from *S. exigua* and their homologs in other insect species. Different colours are used to represent the main branches based on the different motifs found by MEME motif analysis. Accession numbers of each sequence are indicated in Table 3.2. Se: *S. exigua*, Sf: *S. frugiperda*, Sl: *S. litura*, Slitt: *S. littoralis*, Mc: *M. configurata*, Mb: *M. brassicae*, Bm: *B. mori*, Ha: *H. armigera*, Dm: *D. melanogaster*. Red arrows denote more relevant homologs.

Table 3.2. *S. exigua* REPAT members and their homologs in other insect species.

Insect specie	Gene name	GenBank no.	Code	Expression detected in*
<i>S. exigua</i>	<i>repat1</i>	EF153740	Se REPAT1	MG
	<i>repat2</i>	EF153741	Se REPAT2	MG
	<i>repat3</i>	EF153742	Se REPAT3	MG
	<i>repat4</i>	EF153743	Se REPAT4	MG
	<i>repat5</i>	FJ595234	Se REPAT5	MG
	<i>repat6</i>	FJ595235	Se REPAT6	MG
	<i>repat7</i>	FJ595236	Se REPAT7	MG
	<i>repat8</i>	JN166083	Se REPAT8	MG
	<i>repat9</i>	JQ619191	Se REPAT9	MG
	<i>repat10</i>	JQ619192	Se REPAT10	Unk.
	<i>repat11</i>	JQ619193	Se REPAT11	MG
	<i>repat12</i>	JQ619194	Se REPAT12	MG
	<i>repat13</i>	JQ619195	Se REPAT13	MG
	<i>repat14</i>	JQ619196	Se REPAT14	MG
	<i>repat15</i>	JQ619197	Se REPAT15	MG
	<i>repat16</i>	JQ619198	Se REPAT16	MG
	<i>repat17</i>	JQ619199	Se REPAT17	Unk.
	<i>repat18</i>	JQ619200	Se REPAT18	MG
	<i>repat19</i>	JQ619201	Se REPAT19	MG
	<i>repat20</i>	JQ619202	Se REPAT20	Unk.
	<i>repat21</i>	JQ619203	Se REPAT21	MG
	<i>repat22</i>	JQ619204	Se REPAT22	MG
	<i>repat23</i>	JQ619205	Se REPAT23	MG
	<i>repat24</i>	JQ619206	Se REPAT24	MG
	<i>repat25</i>	JQ619207	Se REPAT25	MG
	<i>repat26</i>	JQ619208	Se REPAT26	MG
	<i>repat27</i>	JQ619209	Se REPAT27	MG
	<i>repat28</i>	JQ619210	Se REPAT28	MG
	<i>repat29</i>	JQ619211	Se REPAT29	Unk.
	<i>repat30</i>	JQ619212	Se REPAT30	MG
	<i>repat31</i>	JQ619213	Se REPAT31	MG
	<i>repat32</i>	JQ619214	Se REPAT32	MG
	<i>repat33</i>	JQ619215	Se REPAT33	MG
	<i>repat34</i>	JQ619216	Se REPAT34	Unk.
	<i>repat35</i>	JQ619217	Se REPAT35	MG
	<i>repat36</i>	JQ619218	Se REPAT36	MG
	<i>repat37</i>	JQ619219	Se REPAT37	MG
	<i>repat38</i>	JQ619220	Se REPAT38	MG
	<i>repat39</i>	JQ619221	Se REPAT39	MG
	<i>repat40</i>	JQ619222	Se REPAT40	MG
	<i>repat41</i>	JQ619223	Se REPAT41	MG
	<i>repat42</i>	JQ619224	Se REPAT42	MG
	<i>repat43</i>	JQ619225	Se REPAT43	MG
	<i>repat44</i>	JQ619226	Se REPAT44	MG
	<i>repat45</i>	JQ619227	Se REPAT45	MG

Chapter 3:

A new gene superfamily of pathogen-response (repat) genes, classification and expression analysis.

	<i>repat46</i>	JQ619228	Se REPAT46	Unk.
<i>S. frugiperda</i>	<i>Sfrepat2</i>	DV075894	Sf REPAT2	MG
		FP376948	Sf FP376948	MG
		FP356037	Sf FP356037	H
		FP379770	Sf FP379770	MG
		EL618670	Sf EL618670	MG
		FP376400	Sf FP376400	MG
		DV076704	Sf DV076704	MG
		FP382275	Sf FP382275	MG
		DV075925	Sf DV075925	MG
		DV079191	Sf DV079191	MG
		FP356176	Sf FP356176	H
		DY779160	Sf DY779160	FB
		DV079883	Sf DV079883	MG, FB
		FP367569	Sf FP367569	MG
		DV077951	Sf DV077951	MG
		DV079323	Sf DV079323	MG
		DV078435	Sf DV078435	MG
		FP381266	Sf FP381266	MG
		DY790900	Sf DY790900	MG
		DY778923	Sf DY778923	H, FB
		DY787458	Sf DY787458	MG
		DY774313	Sf DY774313	H, FB
		DY790762	Sf DY790762	MG, FB
		FP381772	Sf FP381772	MG
		FP364286	Sf FP364286	Unk.
		DY775202	Sf DY775202	FB
		FP358014	Sf FP358014	H, FB
		DY780428	Sf DY780428	FB
		FP352794	Sf FP352794	H
		FP352174	Sf FP352174	H
DY773468	Sf DY773468	FB		
DY788545	Sf DY788545	FB		
FP376655	Sf FP376655	MG		
DY791086	Sf DY791086	MG		
FP357274	Sf FP357274	H		
<i>S. litura</i>	<i>Slrepat2</i>	GW413730	SI REPAT2	MG
		GW415306	SI GW415306	MG
		GW414398	SI GW414398	MG
		GW414387	SI GW414387	MG
		GW417003	SI GW417003	MG
		GW416621	SI GW416621	MG
		GW413972	SI GW413972	MG
		GW414460	SI GW414460	MG
		GW416159	SI GW416159	MG
		GW419715	SI GW419715	MG
		GW416115	SI GW416115	MG
		GW415901	SI GW415901	MG

		GW413767	SI GW413767	MG
		GW420353	SI GW420353	MG
		GW416272	SI GW416272	MG
		EH662392	SI EH662392	Unk.
		GW418316	SI GW418316	MG
		GW419212	SI GW419212	MG
		GW414898	SI GW414898	MG
		GW417126	SI GW417126	MG
		GW414069	SI GW414069	MG
<i>S. littoralis</i>	<i>Slirepat40</i>	JQ660350	Slitt913	Unk.
	<i>Slirepat46</i>	JQ660351	Slitt4878	Unk.
	<i>Slirepat30</i>	JQ660352	Slitt493	Unk.
	<i>Slirepat43</i>	JQ660353	Slitt4021	Unk.
	<i>Slirepat32</i>	JQ660354	Slitt5852	Unk.
	<i>Slirepat2</i>	JQ660355	Slitt5034	Unk.
	<i>Slirepat1</i>	JQ660356	Slitt1076	Unk.
	<i>Slirepat3</i>	JQ660357	Slitt1543	Unk.
	<i>Slirepat6</i>	JQ660358	Slitt3088	Unk.
	<i>Slirepat21</i>	JQ660359	Slitt1119	Unk.
	<i>Slirepat19</i>	JQ660360	Slitt1966	Unk.
	<i>Slirepat14</i>	JQ660361	Slitt2004	Unk.
	<i>Slirepat15</i>	JQ660362	Slitt5337	Unk.
<i>M. configurata</i>	<i>repat2</i>	HM357858	Mc REPAT2	PM
	<i>peritrophic matrix protein</i>	AEA76328	Mc AEA76328	PM
	<i>hmg176a</i>	HM357849	Mc HMG176a	PM
	<i>hmg176b</i>	HM357850	Mc HMG176b	PM
	<i>hmg176c</i>	HM357851	Mc HMG176c	PM
	<i>hmg176d</i>	HM357852	Mc HMG176d	PM
	<i>hmg176e</i>	HM357853	Mc HMG176e	PM
	<i>hmg176f</i>	HM357854	Mc HMG176f	PM
<i>M. brassicae</i>	<i>Mbrepat22</i>	JQ660363	Mb1639	Unk.
<i>B. mori</i>	<i>mbf2</i>	BAA20370		
<i>H. armigera</i>	<i>hmg176</i>	DQ847154.1	Ha HMG176	MG
<i>D. melanogaster</i>	<i>CG13323</i>	NM_136988	Dm CG13323	MG

*Tissues are referred as followings. MG: midgut, H: hemocytes, FB: fat body, PM: peritrophic matrix, Unk.: unknown.

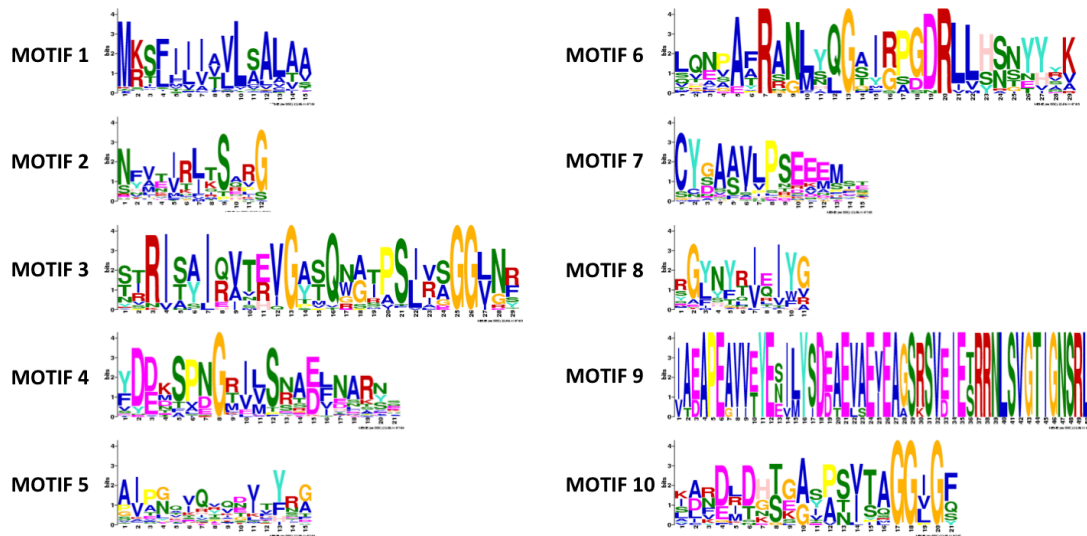


Figure 3.2. Conserved motifs in the REPAT proteins identified by MEME motif analysis. All the reported motifs have an e-value lower than $1e-135$.

Common coding domains relevant for the evolution and function of REPAT proteins were determined using MEME analysis. The most statistically significant motifs (Fig 3.2) were selected (E-value $<e-139$) and their distribution along the different REPATs can be observed in Figure 3.3. In general, a good correspondence between the presence of certain motifs and the protein distribution along the different phylogenetic clades was observed (Fig 3.1 and 3.3). Based on the presence/absence of these domains and their phylogenetic relationship we attempted to organize REPAT proteins in 6 groups (Fig 3.1 and 3.3). Motifs 1, 2 and 5 are present in practically all the REPAT proteins. In contrast, some motifs are specifically detected in members of a particular group. Motif 7 was exclusive of α REPAT members with the presence/absence of motif 4 being the discriminating motif between groups I and II. Within the β REPAT proteins, four main groups could be distinguished. Group III is characterized by the exclusive presence of motif 10. Similarly, group IV shows the exclusive presence of motif 9. Motif 6 was present in all the members of group V although it was also observed in some members of group VI. Group VI was established based on their position on the phylogenetic tree since no common characteristic motifs were observed.

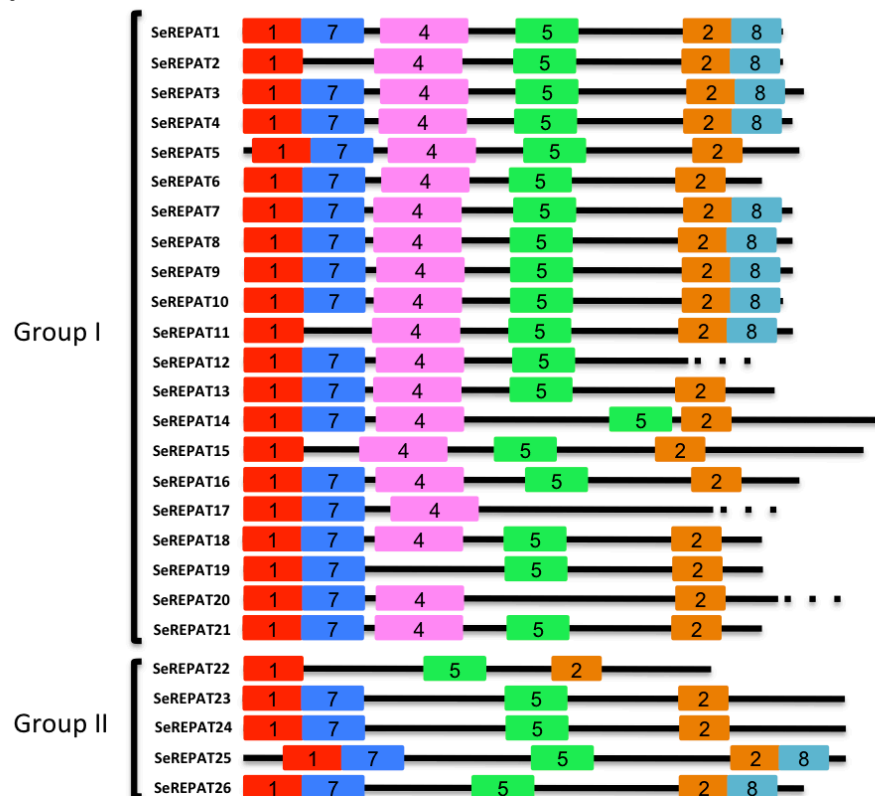
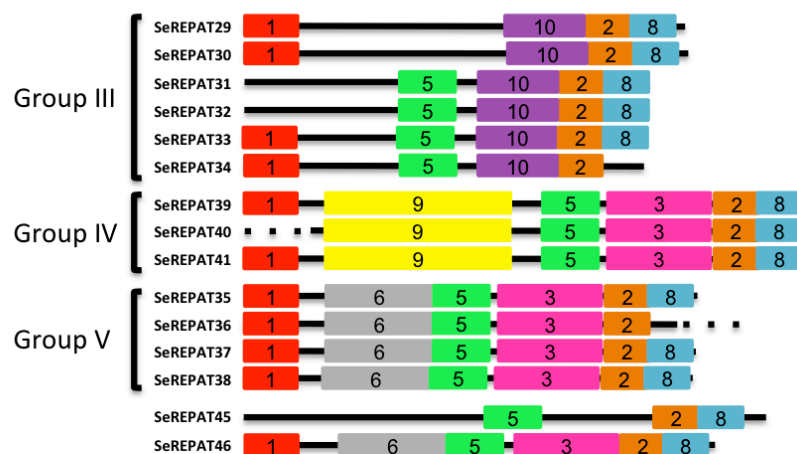
αREPAT proteins**βREPAT proteins****REPAT-like proteins**

Figure 3.3. Group distribution of conserved motifs in *S. exigua* REPAT proteins. The motifs (1-10) identified using MEME motif analyses have been marked on protein sequences. The length and order of the sequences corresponds to the actual length and position of the conserved region in the protein sequence. Discontinuous dots are indicative of hypothetical partial sequences.

Midgut gene expression in response to different bacteria-related treatments

Up-regulation of *repat1* to *4* was first described in the midgut of insects previously exposed to Cry1Ca toxin from *B. thuringiensis*. In this work we have determined the pattern of expression of the *repat* genes under two different conditions: Cry1Ca intoxication and an increase in midgut microbiota. Quantitative-PCR (qPCR) was used to determine the expression level of 46 *repat* genes from *S. exigua*. Due to the low expression of certain *repat* genes in the midgut of the larvae (*repat10*, *17*, *20*, *29*, *34* and *46*) only expression of 40 out of 46 genes was studied.

The effect of the different treatments on *repat* gene expression was studied using two types of midgut preparations. Replicates r1 and r2 were derived from midguts that were directly dissected from the larvae. In contrast r3, r4, and r5 samples, were derived from midguts that were used to compare the gene expression between midgut tissue and midgut stem cells (see materials and methods). Hierarchical cluster analysis for the expression of the different *repat* genes between the different treatments and between different midgut samples was performed (Fig 3.4). Results revealed that values for the two types of midgut samples grouped together (present in the same cluster). In contrast, the different treatments grouped in two different clusters. These results revealed that differences in midgut handling procedures performed did not affect the expression of *repat* gene expression. As a consequence of these findings, the studies of the effect of the different treatments on the *repat* gene expression were analysed considering r1 to r5 samples as replicates of the same treatment.

Simultaneous analysis of the gene expression for all the *repat* genes showed two general trends for the different treatments (Fig 3.4). In general, treatment with Cry1Ca toxin induced a general regulation of *repat* genes (Dunnett's Test; $P < 0.05$). This effect of the treatment was probably due to the down-regulation of their expression for the *repat39* to *44* (green zone) and the up-regulation for most of the other *repat* genes. In contrast, no significant trend was detected for the presence of microbiota in midgut. (Dunnett's Test; $P > 0.05$). Focusing on specific genes, only some genes were significantly (*t*-test) up-regulated after Cry1Ca treatment (Table 3.3).

Simultaneous analysis of the gene expression for all the *repat* genes showed two general trends for the different treatments (Fig 3.4). In general, treatment with Cry1Ca toxin induced a general regulation of *repat* genes (Dunnett's Test; $P < 0.05$). This effect of the treatment was probably due to the down-regulation of their expression for the *repat39* to *44* (green zone) and the up-regulation for most of the other *repat* genes. In contrast, no significant trend was detected for the presence of microbiota in midgut.

(Dunnett's Test; $P > 0.05$). Focusing on specific genes, only some genes were significantly (t -test) up-regulated after Cry1Ca treatment (Table 3.3). Interestingly, *repat* genes showing regulation after Cry1Ca treatment belong to the α REPAT class. No genes from the other classes were significantly regulated. In agreement with the global analysis, none of the *repat* genes were responding to the midgut microbiota.

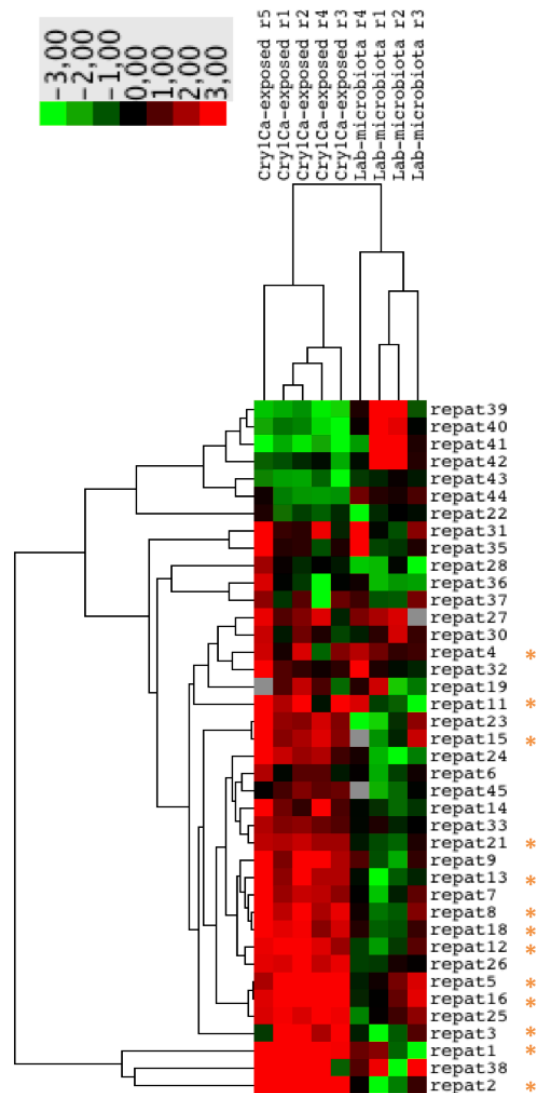


Figure 3.4. Hierarchical cluster display of expression profiles of *repat* genes in *S. exigua* larval midgut under different treatments. Expression values are represented as \log_2 expression ratio (treatment vs control) in the midgut of fifth instar larvae of *S. exigua* and were depicted according to the color scale shown at the top. Grey indicates missing or excluded data. Orange asterisk denotes significant changes in gene expression after Cry1Ca intoxication (t -test, p -value < 0.05).

Table 3.3. Relative expression of the differentially expressed (statistically significant) *repat* genes in the midgut tissue after exposure to Cry1Ca toxin.

Gene	Expression ratio (SEM)
<i>repat1</i>	442.1 (410.0)
<i>repat2</i>	135.2 (53.7)
<i>repat3</i>	13.1 (4.9)
<i>repat4</i>	3.2 (1.1)
<i>repat5</i>	11.6 (2.7)
<i>repat8</i>	9.3 (2.5)
<i>repat11</i>	6.8 (2.3)
<i>repat12</i>	14.4 (6.4)
<i>repat13</i>	9.5 (4.4)
<i>repat15</i>	5.5 (1.5)
<i>repat16</i>	13.0 (2.2)
<i>repat18</i>	7.7 (2.1)
<i>repat21</i>	4.4 (0.3)

Differential expression of *repat* genes in midgut stem cells

Larval midgut from Lepidoptera is formed by stem and differentiated cells (columnar and goblet cells) that are responsible for the midgut homeostasis (Hakim, *et al.*, 2010). Due to the midgut specificity for most *repat* genes, their expression after midgut damage, and the fact that the HaHMG176 homolog from *H. armigera* has been found in the midgut's basal membrane (Wang, *et al.*, 2007), we decided to explore the expression of *repat* genes in midgut stem cells. This cell type is responsible for the epithelial renewal. We decided to determine if *repat* genes are also expressed in midgut stem cells and, if so, whether its expression is regulated after cell damage (Cry1Ca treatment) or by the increase in midgut microbiota. Due to the difficulties in obtaining pure stem cells, we decided to analyse the expression of *repat* genes in samples enriched in midgut stem cells (MSC).

Relative expression of the different *repat* genes in the MSC preparation in relation to the whole midgut tissue samples was determined (Table 3.4). Under normal conditions (non-exposed), we observed expression of the 40 studied *repat* genes in the midgut tissue as well as in the MSC sample (data not shown). *Repat4*, 21, 32, and 42 expression was significantly higher in MSC than in whole midgut (Table 3.4). In contrast, although *repat23*, 30, 31, and 33 were expressed in stem cells, a higher expression was observed in the midgut tissue. No differences in sample distribution were found for the rest of *repat* genes. With the exception of four genes (*repat22*, 23, 27 and 33), a similar pattern of gene expression distribution was observed in samples

obtained from Cry1Ca exposed larvae (Table 3.4). This same distribution is due to a similar regulation of *repat* genes in the midgut tissue as in the stem cells after Cry1Ca treatment. An important change in gene expression distribution between MSC and midgut tissue samples was observed for the Lab-microbiota treatment. We observed an increase in the number of genes that were more highly expressed in the MSC sample when compared to the midgut tissue sample (Table 3.4). Since previous results with midgut samples did not show a significant response to Lab-microbiota (Fig 3.4), the change in distribution can be attributed to the up-regulation of these genes mostly or exclusively in stem cells, suggesting that midgut stem cells have a higher expression of certain *repat* genes when midgut microbiota is more abundant (Fig 3.5).

Table 3.4. Expression ratio of the differentially expressed *repat* genes in the enriched midgut stem cells preparation relative to the whole midgut tissue sample.

Gene	Expression ratio (SEM)		
	Non-exposed	Cry1Ca exposure	Microbiota
<i>repat1</i>	NS ¹	NS	NS
<i>repat4</i>	7.5 (4.6)	16.0 (10.2)	9.6 (3.1)
<i>repat5</i>	NS	NS	2.0 (0.2)
<i>repat13</i>	NS	NS	4.7 (1.5)
<i>repat15</i>	NS	NS	1.6 (0.1)
<i>repat18</i>	NS	NS	5.4 (0.4)
<i>repat21</i>	3.6 (1.9)	2.8 (1.4)	5.3 (0.3)
<i>repat22</i>	NS	3.7 (2.2)	3.4 (0.6)
<i>repat23</i>	-3.0 (1.5)	NS	NS
<i>repat27</i>	NS	-2.9 (0.6)	-5.2 (3.5)
<i>repat30</i>	-65.5 (6.1)	-9.4 (2.7)	-8.8 (6.4)
<i>repat31</i>	-9.7 (6.3)	-7.8 (6.0)	NS
<i>repat32</i>	18.3 (13.6)	-6.5 (0.2)	-4.6 (0.4)
<i>repat33</i>	-2.7 (1.3)	NS	NS
<i>repat35</i>	NS	NS	3.3 (1.4)
<i>repat42</i>	3.1 (0.2)	9.0 (6.9)	8.0 (2.0)
<i>repat43</i>	NS	NS	-3.2 (1.3)
<i>repat45</i>	NS	NS	3.5 (1.3)

¹ NS, expression ratio was found not statistically different from 1 (p -value >0.05)

Higher expression in midgut stem cells, or midgut tissue, has been highlighted in red and green colors, respectively.

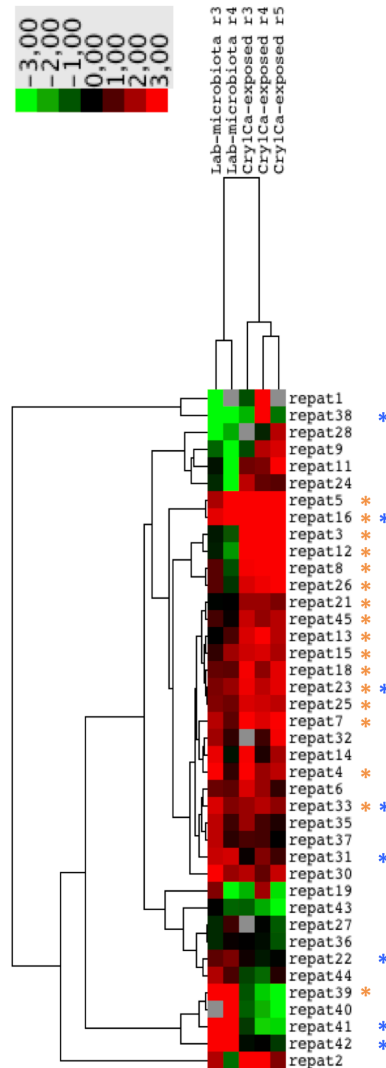


Figure 3.5. Hierarchical cluster display of expression profiles of *repat* genes in *S. exigua* midgut stem cells. Expression values are represented as \log_2 expression ratio in the midgut of fifth instar larvae of *S. exigua* and were depicted according to the color scale shown at the top. Grey indicates missing or excluded data. Orange and blue asterisks denote significant changes in gene expression after Cry1Ca intoxication and midgut microbiota, respectively.

Midgut proliferation rate did not show differences between treatments

Recent studies in *D. melanogaster* adults have shown an increase in the epithelial renewal of the gut after ingestion of some bacteria, such as *Erwinia carotovora* 15 (Buchon, *et al.*, 2009) or *Serratia marcescens* (Cronin, *et al.*, 2009), as well as due to the presence of indigenous microbiota (Buchon, *et al.*, 2009) (Chatterjee and Royet, 2009). As the renewal is based on the proliferation of stem cells, it is tempting to hypothesize that an elevated expression of *repat* genes in midgut stem cells might be a consequence of an increase of midgut proliferation in the larvae.

Midgut proliferation between non-exposed, Cry1Ca exposed and Lab-microbiota were compared by measuring the incorporation of EdU (a nucleoside analog) into de novo-synthesized DNA. Under our conditions, around 28%, 24% and 34% of the cells were EdU positive in Non-exposed, Cry1Ca exposed and Lab microbiota, respectively (Fig 3.6). No significant differences were observed (compared with non-exposed insects) for either of the two treatments tested, indicating that larvae neither respond to Cry1Ca treatment nor to the Lab-microbiota presence by activation of midgut proliferation.

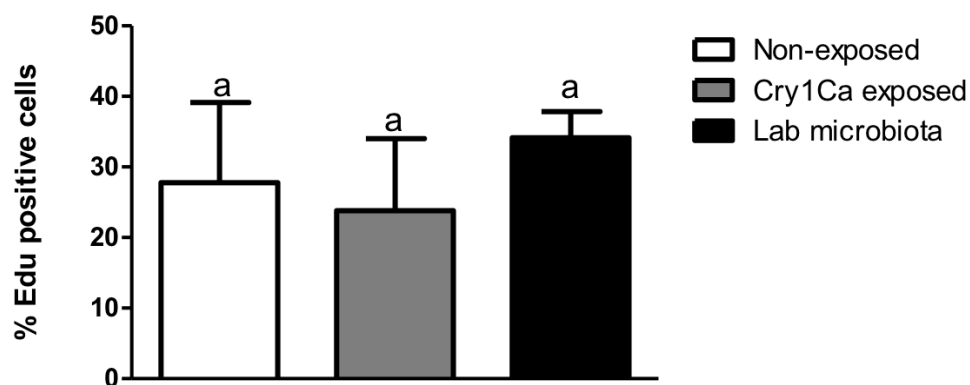


Figure 3.6. Midgut proliferation in *S. exigua* larvae after different conditions. Percentage of EdU positive cells (% of new synthesized DNA) in the different conditions tested: non-exposed, Cry1Ca exposed, and Lab-microbiota. Larvae were injected with EdU reagent and 5 hours after injection, midguts were dissected, cells dissociated and stained for Hoechst and EdU. Not significant differences (*t*-test, *p*-value <0.05) are denoted by the same letter.

5.4 DISCUSSION

Repat genes were first described in a Suppression Subtractive Hybridization (SSH) library comparing the gene expression between larvae from *S. exigua* exposed to *B. thuringiensis* Cry1Ca toxin and non-exposed insects (Herrero, *et al.*, 2007). Four *repat* members (1 to 4) were up-regulated in response to Cry1Ca and Cry1A toxin intoxication as well as to baculovirus infection (Herrero *et al.*, 2007). Later, three new members (*repat5* to 7) of the family were found to be highly expressed in a colony of *S. exigua* that had developed resistance to the *B. thuringiensis*-based product Xentari™ (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010). More recently, yeast two-hybrid experiments were developed to identify REPAT1-interacting proteins allowing the identification of an additional REPAT protein (REPAT8) (Navarro-Cerrillo, *et al.*, 2012). In the present

work, we have mined the *S. exigua* larval transcriptome (Pascual *et al.*, 2012) to identify REPAT-related proteins, revealing the existence of at least 46 *repat* genes in *S. exigua*. Phylogenetic and MEME motif analysis has allowed the identification of two main classes of REPAT proteins. The α REPAT were unique to *Spodoptera spp* and closely related species, such as *Mamestra spp* (both belong to the Noctuidae Subfamily). In contrast, no homologs to α REPAT proteins could be identified in other, more distantly related species such as *H. armigera*. These results suggest subfamily and/or species-specific expansions of this group of proteins after the separation from the common ancestors. *Spodoptera spp* as well as *Mamestra spp* are generalist insects that feed on a wide range of plants. Another important group of REPAT proteins are the β REPATs which are more distantly related to α REPAT. In contrast to the α REPAT group, we have been able to identify homologs to the β REPAT in more distantly related species and even in another insect order (Diptera).

Among the REPAT homologs in other species, only MBF2 proteins have been functionally characterized. MBF2 proteins were found to be transcriptional co-activators involved in developmental processing (Liu, *et al.*, 2000). Moreover, MBF2-R, a protein with strong homolog to MBF2, was found to be up-regulated after exposure to different types of bacteria (Tanaka, *et al.*, 2010). MBF2 co-activation requires translocation into the cellular nucleus. Similarly, previous experiments with REPAT1 (Navarro-Cerrillo, *et al.*, 2012) have shown its nuclear translocation in the presence of REPAT8. Based on these findings, it is likely that REPAT proteins could function as transcriptional activators when they are present in the nucleus. Given the large number of members in this superfamily, the fact that different members can interact, and their heterogeneous expression profile, it is tempting to speculate that different combinations of REPAT proteins can be linked to different processes that involve REPAT-mediated transcriptional co-activation.

Homology between *repat* genes from different species has not only been found at the protein sequence level, but also at the level of their tissue- and treatment-specific expression. Although expression of some *repat* genes has been found in hemocytes and fatbody, they are mainly expressed in the insect gut. Indeed, for most *repat* genes, their expression is restricted to the gut (Table 3.2). Moreover, as it occurs for *repat1* to *8* from *S. exigua*, some of these genes have been described to be regulated after exposure to different pathogens and immune elicitors (Negre, *et al.*, 2006, Rodriguez-Cabrera, *et al.*, 2008). In this work we have analysed the response of *repat* genes from *S. exigua* to two different conditions. In one case we analysed the effect of a pore forming toxin (Cry1Ca) that damages the midgut epithelium (Bravo, *et al.*, 2007) of the

larvae. In a second case, we have analysed the effect of the midgut microbiota that is known to stimulate the insect immune response (Buchon, *et al.*, 2009, Freitag, *et al.*, 2007, Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010). In general, these experiments have shown regulation of *repat* genes in response to Cry1Ca toxin. This regulation was specifically reflected as an up-regulation of α REPAT, suggesting a role of this class of proteins in the stress response of the midgut. Recent studies have demonstrated the role of MAPK (Mitogen-activated protein kinases) p38 in activating the responses to Cry toxins in *Manduca sexta*, *Aedes aegypti* (Cancino-Rodezno, *et al.*, 2010) and *Caenorhabditis elegans* (Huffman, *et al.*, 2004). It would be interesting to determine if the expression of *repat* genes is regulated by the MAPK p38 pathway. Additionally, Valaitis *et al* (Valaitis, 2008) have reported the shedding of glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-anchored receptors (aminopeptidase N (APN) and alkaline phosphatase) in the midgut of *Lymantria dispar* in response to intoxication with Cry1A toxins. Higher levels of APN activity were found in the midgut lumen of a *B. thuringiensis*-resistant colony of *S. exigua* (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010). Compared to the susceptible insects, these resistant insects also showed higher levels of expression of certain *repat* genes. Mechanisms controlling the shedding of these proteins are not well understood. It may therefore be possible that up-regulation of α REPAT is somehow contributing or responding to the shedding of these receptors.

Proliferation of midgut stem cells and induction of their differentiation after treatment of *Heliothis virescens* cultured midgut cells with Cry1Ac has been reported by Loeb *et al* (2001). In the present work we have studied the expression of *repat* genes in midgut stem cells as well as the midgut proliferation rate under the different treatments. In the case of Cry1Ca treatment, many α *repat* genes were up-regulated in stem cells as well as in the midgut; however, no enrichment of their expression was observed in stem cells (Fig 3.5). Moreover, no increase in midgut proliferation was observed after Cry1Ca treatment. These *in vivo* experiments suggest that midgut proliferation is not occurring after Cry1Ca intoxication in *S. exigua* larvae. As a consequence, up-regulation of *repat* genes seems to be independent from the midgut proliferation mechanisms. In the midgut of *D. melanogaster* adults, ingestion of pathogenic as well as indigenous bacteria induces gut proliferation and epithelial renewal (Buchon, *et al.*, 2009). Similar to Cry1Ca-treated larvae, increase in the abundance of midgut microbiota (Lab-microbiota insects) does not have any effect on the midgut proliferation rate.

In summary, with the present study we have established a new superfamily of insect proteins composed, in the case of *S. exigua*, of at least 46 different members.

Chapter 3:

A new gene superfamily of pathogen-response (repat) genes, classification and expression analysis.

We have classified them into two main groups, based on their sequence and expression characteristics. Some REPAT members have shown relative high homology to transcriptional co-activators in other species of Lepidoptera, that together with previous results (Navarro-Cerrillo, *et al.*, 2012), suggest a similar or related function for the different REPAT members. The high diversity found in their sequence and in their expression profile suggest that REPAT proteins may be involved in multiple processes in the insect midgut physiology that could be of relevance for the development of novel pest control strategies or improvement of the current pest control agents.

CHAPTER 4:

Repeat homologs in *Drosophila melanogaster*

6.1 Introduction

The intestinal epithelium has an important role as barrier to both native microbiota and pathogenic agents. Studies on the transcriptional responses to pathogens have shown the regulation of several genes due to the infection as well as to changes in microbiota load (Buchon, *et al.*, 2009, Freitag, *et al.*, 2009). In previous studies in our laboratory, a gene family of *Spodoptera exigua* was identified not only in response to *Bacillus thuringiensis* (toxins and commercial product) but also to baculovirus infection (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010, Herrero, *et al.*, 2007, Navarro-Cerrillo, *et al.*, 2012). In the previous chapter we have established the REPAT superfamily of insect proteins with at least 46 members in *S. exigua*. Phylogenetic and sequence analysis has allowed the description of two main groups in this superfamily. One of these groups, the β REPAT members permitted the identification of homologous proteins in other Lepidoptera species, and even in other insect order, such as Diptera, to which *D. melanogaster* belongs.

There are two main reasons that make *D. melanogaster* a valuable model for studying the immune response (Charroux, *et al.*, 2010, Ferrandon, *et al.*, 2007, Lemaitre, *et al.*, 2007). First, *D. melanogaster* studies can be translated to other organisms by comparative genomics due to the fact that molecular mechanisms that control important biological processes have been often conserved through evolution. And second, tools that are currently available for working with *Drosophila* are very convenient for the study of basic biology. For these reasons, the application of *Drosophila* genetics in order to understand the mechanisms for detecting and neutralizing infections has generated insights into insect immunity and uncovered similarities with mammalian innate immune responses (Apidianakis, *et al.*, 2011, Chamilos, *et al.*, 2011, Pandey, *et al.*, 2011). Moreover, the *Drosophila*-bacteria interaction provides a useful model to decipher the insect immune responses and specially to understand the role of homologous proteins and genes in other insect species.

Over the last years, the interaction between *Drosophila* and their entomopathogens has been widely studied (Welchman, *et al.*, 2009). From these studies, two bacterial species have been described to stimulate strong antimicrobial peptide gene expression after oral ingestion, *Erwinia carotovora subsp. carotovora* (Ecc15) and *Pseudomonas entomophila* (Pe) (Buchon, *et al.*, 2009, Jiang, *et al.*, 2011). *Erwinia carotovora* is a phytopathogenic gram-negative bacterium that causes soft-rot of fruit and uses insects as vectors for environmental dissemination. An isolate from

this species, named *Ecc15*, has the capacity to persist in the *Drosophila* gut and to trigger a strong systemic immune response in larvae following gut infection. *Ecc15* ingestion provokes a massive increase in epithelial renewal in the gut of *Drosophila* (Buchon, *et al.*, 2009). In contrast to *Ecc15*, *P. entomophila* is a natural bacterial pathogen of *Drosophila* that induces both systemic and local immune responses in *Drosophila* and causes food uptake cessation after oral infection (Liehl, *et al.*, 2006, Vodovar, *et al.*, 2005), being able to disrupt the gut by blocking epithelium renewal (Buchon, *et al.*, 2009). This bacterium is highly pathogenic for its host and it also effectively kills members from other insect orders, such as Lepidoptera (Fedhila, *et al.*, 2010). The genome sequence of *P. entomophila* has been completed and reveals the existence of a large set of genes encoding putative virulence factors such as proteases, lipases, toxins, alginate synthesis, and adhesion factors (Liehl, *et al.*, 2006, Oputa, *et al.*, 2011, Vallet-Gely, *et al.*, 2010, Vodovar, *et al.*, 2005).

In previous studies, we identified *CG13323* and *CG13324* as *repat* homolog genes in *D. melanogaster*. Since *D. melanogaster* is a widely studied animal model, it provides information and tools for studying gene function. Therefore, we decided to study the *Drosophila repat* homologs to increase our understanding of the role of these genes in the response to pathogens. First, a comparative study of their expression pattern was performed to confirm similarities with *repat* genes from *S. exigua*. Secondly, mutant strains were generated to study the possible role of *repat* homologs in the susceptibility to bacterial pathogens.

6.2 Materials and methods

In silico* data-expression analysis of *CG13323* and *CG13324

Information about *CG13323* and *CG13324* from *D. melanogaster* is available in the FlyBase (<http://flybase.org/>). *CG13323* and *CG13324* are localized in tandem in the second chromosome and in reverse sense. FlyAtlas (<http://flyatlas.org>) searches were performed to check the tissue and stage specificity of the *CG13323* and *CG13324* expression (Chintapalli, *et al.*, 2007). Protein interactions were predicted with BioGrid software (<http://thebiogrid.org>).

Alignment and phylogenetic tree construction with the deduced amino acid sequences of the REPAT proteins was performed using the CLUSTALX program (Thompson, *et al.*, 1997). Phylogenetic reconstruction was obtained by the neighbour-joining method (Saitou and Nei, 1987) together with bootstrap analysis using 1000 replicates.

Knock out construction by FLP-FRT deletion

FRT-bearing transposon insertions are widespread throughout the genome of *Drosophila* and they can be used in the presence of FLP recombinase to efficiently isolate deletions with precisely defined endpoints (Golic, *et al.*, 1996). The employed methodology is described in Parks *et al.* (2004) (Parks, *et al.*, 2004). The P-elements used for the deficiency generation by FLP-FRT recombination were PBac[WH]f07746 and PBac[WH]f04593 (<http://flybase.org/cgi-bin/gbrowse/dmel/>). These P-elements are flanking both genes allowing the simultaneous deletion of *CG13323* and *CG13324* genes through their mobilization. A complete list of stocks is provided in table 4.1. Progeny was screened for the detection of the deletion by real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) of the *CG13323* gene and PCR detection of a resulting hybrid element using element-specific primers (Table 4.2).

Table 4.1 *Drosophila* stocks used for generating deletions.

Stock No.	Collection	Genotype
1929	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center	P[ry[+t7.2]=hsFLP]12, y[1] w[*]; sna[ScO]/CyO
5907	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center	w[1118]/Dp(1;Y)y[+]; sna[ScO]/SM6a
5905	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center	w[1118]
5439	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center	w[1118]; In(2LR)Gla, wg[Gla-1] Bc[1]/CyO266
F04593	Exelixis at Harvard Medical School	PBac[WH]f04593
F07746	Exelixis at Harvard Medical School	PBac[WH]f07746
150225	<i>Drosophila</i> Genetic Resource Center	w[1118]; Df(2R)ED2311/SM6a
7871	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center	w[1118]; Df(2R)Exel8057/CyO

Table 4.2 Specific primers used in this study.

Gene Name		Primer sequence	Application
WH3' plus		CCTCGATATACAGACCGATAAAAC	PCR
reg3' 731		TTATCGCTCGCAGTTTTGTG	PCR
WH5' plus		TCCAAGCGGCGACTGAGATG	PCR
f07746	Forward	AAAAGGATGAAACTTCAACCAGA	PCR
Rp49	Forward	GACGCTTCAAGGGACAGTATCTG	RT-qPCR
	Reverse	AAACGCGGTTCTGCATGAG	RT-qPCR
Diptericin	Forward	GCTGCGCAATCGCTTCTACT	RT-qPCR
	Reverse	TGGTGGAGTGGGCTTCATG	RT-qPCR
Upd3	Forward	GCGGGGAGGATGTACC	RT-qPCR
	Reverse	GTCTTCATGGAATGAGCC	RT-qPCR
Vein	Forward	AGCCCATGAGGGTCAC	RT-qPCR
	Reverse	AGCTCGGAACGTCTTT	RT-qPCR
CG13323	Forward1	ATGCGTCTTCTGCTCATCCT	PCR
	Reverse	TAACGACCCAGATCTCGAC	PCR and RT-qPCR
	Forward2	ACTATCCCGCCGATTCTAC	PCR and RT-qPCR
CG13324	Forward	CAGGGAAGTTCGCAATC	PCR and RT-qPCR
	Reverse	CACTTAACGACCCAG	PCR and RT-qPCR

Over-expressing mutants construction

Full-length cDNA of *CG13323* (IP04046, iPCR collection from Drosophila Genomic Resource Center) was cloned into the Gateway System (Invitrogen, Carlsbad, USA). For that purpose, *CG13323* specific primers with a linker for the directional insertion in the vector were designed (Forward: AAA AAG CAG GCT GTA TGC GTC TTC TGC TCA TCC TCT CAG TTG; Reverse: AGA AAG CTG GGT GAC GAC CCC AGA TCT CGA CGG TGG AG). A second PCR step was necessary to have the complete *attB* endings added to *CG13323* ORF (Forward: GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CT; Reverse: GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT). *CG13323* ORF was amplified and cloned into pDONRT221 (Annex II) using BP Clonase II enzyme (Invitrogen). Afterwards *CG13323* was recombined into three different vectors: pTW, pTWH and pTWG (Annex II) using LR Clonase II (Invitrogen). pTW, pTWH and pTWG are vectors for the expression of *CG13323* without any tag, with hemagglutinine tag (HA) and GFP fused, respectively. Clones were verified by sequencing and positive clones were used for plasmid isolation with Qiagen Plasmid MidiPrep Kit (Qiagen) and sent to Fly-Facility (<http://www.fly-facility.com>, France) for *Drosophila* transgenesis injection services. The genomic localization of the transgenes was carried out by Valentia Biopharma (<http://www.valentiabiopharma.com>, Spain) using 30 flies of each line.

DNA isolation and PCR

DNA isolation was performed using two different methods. For the first method, samples (one fly) were homogenized in 160 μ l of chilled Solution I (10 mM Tris, 60 mM NaCl, 5% sucrose, 10 mM EDTA, pH 7.8). Then, 200 μ l of Solution II (1.25% SDS, 5% sucrose, 10 mM EDTA, pH 8.0) were added and samples were incubated for 30 min at 65 °C. Then, 60 μ l of chilled potassium acetate (3 M, pH 5.0) were added to each sample and kept at -20 °C for 20 min. DNA was precipitated using the isopropanol-ethanol method and then solubilised in 100 μ l TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). The second method was performed using squishing buffer (SB) (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl, 200 μ g/mL proteinase K, pH 8.2). For that, each single fly was mashed with 50 μ l SB and incubated at 37 °C for 1 h. Finally, proteinase K was inactivated heating to 95 °C for 10 min.

The amplification reaction was performed using the GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison), in a final volume of 25 μ l: 0.25 μ l of GoTaq® DNA Polymerase, 5 μ l 5x Polymerase Buffer, 0.5 μ l dNTPs (10 mM) 0.75 μ l DNA, 1 μ l of each primer (10 μ M) and 16.5 μ l of distilled water. The conditions of the reactions were the following: a

previous step at 95 °C for 2 min, 35 cycles of 30 s at 95 °C, 1 min at 45 °C and 3 min at 72 °C, and a final step at 72 °C for 5 min. Specific primers used in PCR are shown in Table 4.2.

Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)

Total RNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen) and the RNA concentration was measured in a Nanodrop. When RNA was extracted from guts (N=15 per replica) 1 µl glycogen (20 mg/ml) was added with the isopropanol in the precipitation step. Total RNA (1 µg) was reverse transcribed into cDNA using SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) using the manufacturer's protocol.

qPCR was performed using two different systems with their respective standard protocols. One system was LightCycler®FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche, Mannheim) on a LightCycler 2.0 (Roche) and the other was the SYBR Green RT-PCR kit (Applied Biosystems) with the StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Specific primers used in RT-qPCR are shown in Table 4.2. Expression levels were normalized using the expression levels of a non-differentially expressed *rp49* gene using the formula $(Ct_{\text{gene, infected}} - Ct_{\text{rp49, infected}}) - (Ct_{\text{gene, unchallenged}} - Ct_{\text{rp49, unchallenged}})$. Differences in relative expression were checked with a *t*-test using the GraphPad Prism program (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA).

Bacterial strains and infection experiments

Infections were performed with *Pseudomonas entomophila* (Pe) in both adults and larvae. The Pe suspension was obtained from an overnight culture at 29 °C; the optical density at 600 nm was adjusted to 200 (which corresponds to ca. 10¹¹ cfu per ml). Adult infections were performed by mixing an equal volume of the Pe suspension with a solution of 5% sucrose (1:1) and then deposited on a filter disk that completely covered the surface of the standard fly medium in the rearing vial. Flies were maintained at 29 °C. Larval infections were performed by mixing 200 µl of the Pe suspension with 400 µl of crushed banana (1:3). Last instar larvae were transferred to the infected banana medium and let them feed at 29 °C. After 30 min, they were transferred to vials with *Drosophila* medium without yeast for 3.5 h and finally transferred to juice agar plate and maintained at 29 °C.

Drosophila stocks and crosses were maintained at 25 °C in tubes containing standard fly medium devoid of living yeast. F1 progeny carrying both the *UAS* construct and the *Gal4* driver were transferred to 29 °C until the infection experiment for optimal

efficiency of the *UAS/Gal4* system. Statistical analyses were done by log-rank test, and P values <0.05 were considered significant.

6.3 Results

CG13323 and CG13324 share characteristics with *S. exigua repat* genes

Available information about *CG13323* and *CG13324* in the FlyBase database provided some clues about these *repat* homologs but its molecular function is still unknown. As described in the FlyAtlas, *CG13323* and *CG13324* are highly expressed in midgut and Malpighian tubules in both adults and larvae. This gut specificity is a shared characteristic with *repat* genes (Hernandez-Rodriguez, *et al.*, 2009, Herrero, *et al.*, 2007). Additionally, the *CG13323* and *CG13324* expression is up-regulated after bacterial and viral infection (Buchon, *et al.*, 2009, Carpenter, *et al.*, 2009), similarly to *repat* genes (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010, Herrero, *et al.*, 2007, Navarro-Cerrillo, *et al.*, 2012). As with REPAT sequences, analysis of the predicted sequence of *CG13323* and *CG13324* proteins using SignallP software (Nordhal, *et al.*, 2011) revealed the presence of a predicted signal peptide with a cleavage site between position 19 and 20 (Fig 4.1). This region corresponds with the motif 1 described in the REPAT protein superfamily and it is also present in these sequences from *D. melanogaster* (Navarro-Cerrillo, *et al.*, 2012).

Previous studies about the genomic structure and the promoter region of *repat1* revealed two sequences of the consensus STAT binding sites TTCN²⁻⁴GAA (*GAS* element) (Hernandez-Rodriguez, *et al.*, 2009). Searches in the promoter region of *CG13323* revealed the presence of at least five of these STAT binding sites in this region. Using the BioGRID tool, *CG13323* protein was identified to interact with two proteins by the Yeast Two-Hybrid method: Sgt (small glutamine-rich tetratricopeptide containing protein, *CG5094*) and Tequila (*CG4821*). Studies about the possible function of Sgt, based on InterPro domains, suggest binding as molecular function, whereas experimental evidences suggest its involvement in neuromuscular synaptic transmission. Tequila is predicted to have a serine-type endopeptidase activity and the experimental evidences support their involvement in long-term memory. Serine proteases had also been described to be involved in insect immune response (Lemaitre, *et al.*, 2007).

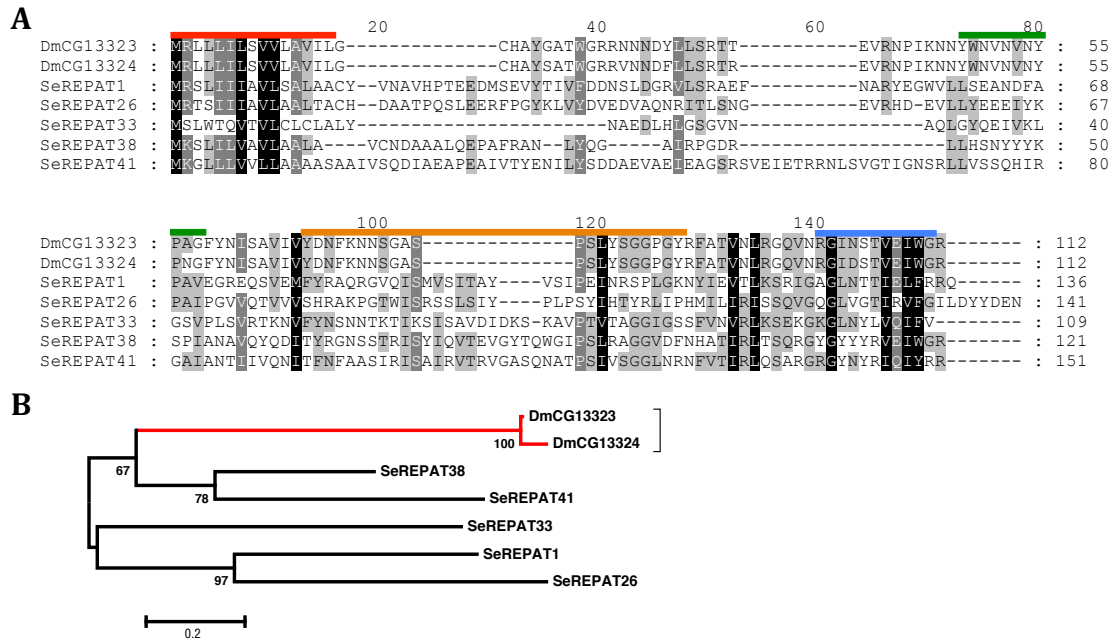


Figure 4.1 Sequence comparison of *Drosophila* homologs and REPAT proteins. (A) Alignment of the deduced amino acid sequences from CG13323, CG13324 and a representative REPAT protein from each group: group I (SeREPAT1), group II (SeREPAT26), group III (SeREPAT33), group IV (SeREPAT41) and group V (SeREPAT38). Conserved motifs in *Drosophila* sequences are denoted by colours: red for motif 1 (with signal peptide), green for motif 2, orange for motif 10 and blue for motif 8. (B) Phylogenetic tree derived from CLUSTALW alignment by the neighbour-joining method. Bootstrap values are shown.

Generation of knock out mutants.

Different fly lines were established after FRT recombination and the deletion was checked by RT-qPCR. When the Ct value obtained for a line was higher than 30 in quantitative PCR, the deletion was additionally checked by PCR. As in this FRT recombination experiment the *miniwhite* gene is not lost, the PCR strategy to follow is the Two-sided PCR described in Parks *et al.* (2004). It was necessary that flies were balanced (in this case with CyO), so only those individuals who have suffered recombination, and thus CG13323 and CG13324 have been deleted, will be amplified for both P-elements. The putative knock out line was confirmed by PCR: the heterozygote amplified for both P-elements, whereas the original transposon-containing lines only amplified for the corresponding single transposon. The PBac[WH]f07746 element was amplified using WH5' plus and F07746 Forward primers, and the PBac[WH]f04593 element was amplified using WH3' plus and reg3' 731 primers listed in table 4.1. The line P52 gave Ct values higher than 30 in qRT-PCR and the PCR results for the P-elements were consistent with the deletion of CG13323 and CG13324 (Fig 4.2). This line was used for further analysis and the knock out heterozygous mutant line (P52/CyO) was crossed with the deficient line 7871

(Df(2R)Exel8057/CyO). The deficiency Df(2R)Exel 8057 spans 22 genes (from CG13323-CG4630) and was obtained from the Bloomington Stock Center. DNA from the P52/Df Exel8057 did not amplify for CG13323 gene (Fig 4.2). The line P52/Df Exel8057 was named as Def^{CG13323-CG13324} and was kept for further analysis.

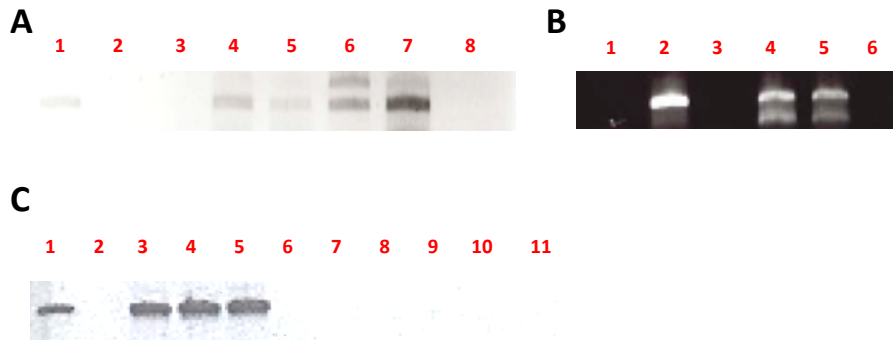


Figure 4.2. PCR confirmation of the CG13323 and CG13324 FRT deletion. (A) Confirmation of the presence of PBac[WH]f07746 element in different strains: 1 iso, 2 and 3 F04593, 4 and 5 F07746, 6 and 7 P52, 8 negative control. (B) Confirmation of the presence of PBac[WH]f04593 element in different strains: 1 iso, 2 F04593, 3 F07746, 4 and 5 P52, 6 negative control. (C) Confirmation of the presence of CG13323 gene in different strains: from 1 to 5 P52/CyO, from 6 to 10 P52/Df, 11 negative control.

Generation of over-expressing mutants.

The full-length cDNA of CG13323 was amplified and cloned into the pDONRT21 vector, and then transferred to the three different transgenesis vectors: pTW, pTWG and pTWH. Clones were sequenced and positive plasmids were sent to Fly Facility for injection of embryos and generation of transgenic lines. In total, nine transgenic lines were obtained: 4 lines without any tag in the CG13323 protein, 4 lines with GFP fused to CG13323 and 1 line with HA tag fused to CG13323. Five of these lines were used for the genomic localization of transgene insertion. For the localization, 30 flies from each line were sent to Valentia Biopharma and the results are listed in Table 4.3. Line UAS-CG13323.1 was used for survival assays because no tag was needed for these experiments and the transgene did not affect other genes.

Table 4.3. Localization of the insertion in the different transgenic lines.

Line	Genomic localization	Gene disruption
UAS-CG13323.1	2L:5106265..5110380 (r=5.26)	No
UAS -CG13323.2	3R:7428711..7432819 (r=5.26)	Insertion inside <i>jupiter</i> gene (microtubule binding).
UAS -CG13323GFP1	2R:2498721..2503249 (r=5.26)	Insertion inside <i>jing</i> gene (transcription repressor activity, central nervous system development; border follicle cell migration; axon guidance; leg disc proximal/distal pattern formation; glial cell migration; tissue regeneration; imaginal disc-derived wing vein specification; specification of segmental identity, maxillary segment; open tracheal system development.).
UAS -CG13323GFP2	2L:2974448..2978932 (r=5.26)	Inside <i>CG9641</i> (exon 3; function is unknown)
UAS -CG13323HA	2L: 4106265..5110380 (r=5.27)	No

Effect of deletion of *CG13323* and *CG13324* genes on the susceptibility to bacterial infection.

Survival assays using *P. entomophila* were performed in both, adults and larvae of *D. melanogaster*. *P. entomophila* is a natural bacterial pathogen of *Drosophila* and oral infections at a high dose induce a strong immune response. Nevertheless, its high pathogenicity is because it quickly causes, upon ingestion, a induction of blockage of food uptake and irreversible gut damage. Different results were found in both larvae and adults. While exposure of adult flies to a lethal dose of *P. entomophila* caused no significant differences compared to control flies, larvae deficient in these genes showed an increase in survival upon infection by *P. entomophila* (Fig 4.3). The mortality rate in $Def^{CG13323-CG13324}$ was four times less than in control larvae.

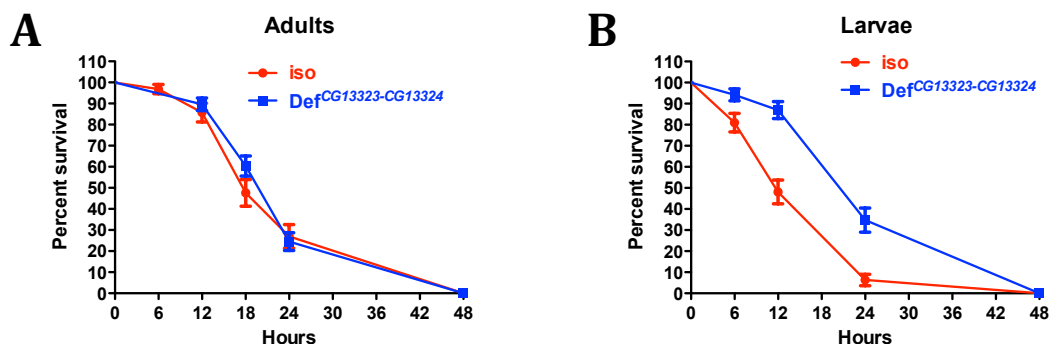


Figure 4.3. Survival analysis of the *CG13323* and *CG13324* deficient line after oral infection with *P. entomophila*. Mean and SE of three independent experiments is shown. A) Adults infected ($P > 0.05$, log-rank test). B) Larvae infected ($P < 0.001$, log-rank test).

Effect of *CG13323* over-expression on the susceptibility against bacterial infection.

Next, we used the *CG13323* over-expression lines to analyze the contribution of this gene to the protection against oral bacterial infection. For the over-expression of *CG13323*, the UAS/GAL4 system (Brand and Perrimon, 1993) was used with UAS-*CG13323.1* line. Previously, over-expression of *CG13323* in the gut had been checked using the NP1-GAL4 driver (genotype: NP1-GAL4>UAS-*CG13323.1*). The line NP1-GAL4>iso was used as a control. Midguts from the transgenic lines showed a significant up-regulation of *CG13323* as compared to the control line under the NP1 driver (Fig 4.4). Because *CG13323* is highly expressed in this transgenic line in the absence of infection, it was used for further analyses.

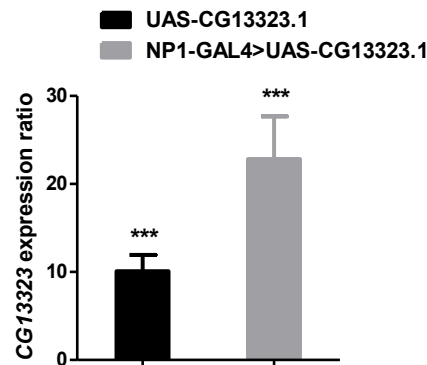


Figure 4.4. *CG13323* expression ratio in the over-expression mutants. Asterisks denote changes in expression that are significantly different from expression in the control larvae (NP1-GAL4>iso) (*t*-test, $P < 0.001$).

Figure 4.5 shows that NP1-GAL4>UAS-*CG13323.1* increased the tolerance to *P. entomophila* both in adults and larvae compared with the control line NP1-GAL4 >iso. The difference was statistically significant in both cases using the long-rank test. These results showed that over-expression of *CG13323*, in both adults and larvae, increases the tolerance to *P. entomophila* infection ca. 2-fold.

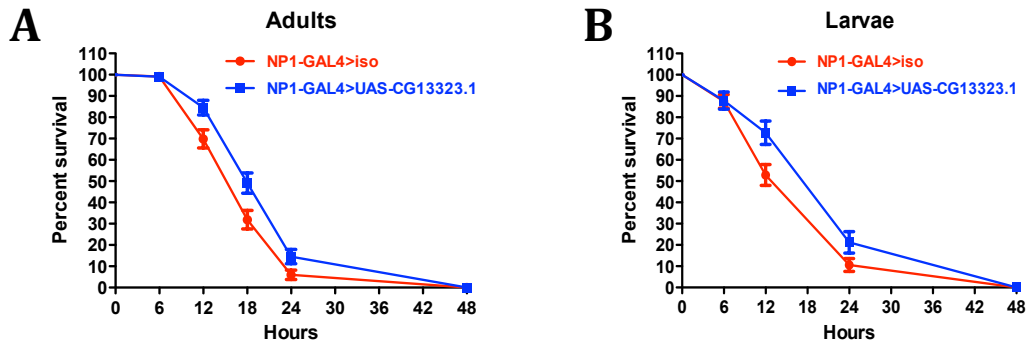


Figure 4.5. Survival analysis of transgenic flies after oral infection with *P. entomophila*. Mean and SE of three independent experiments is shown. A) Adults infected ($P < 0.05$, log-rank test). B) Larvae infected ($P < 0.01$, log-rank test).

Additionally, expression of some marker genes involved in immune response was checked in this transgenic line comparing with the same control to understand the involvement of *CG13323* in the immune system. With this purpose, *diptericin* for the Imd pathway, *upd3* for the JAK-STAT pathway and *vein* for the EGF pathway were analysed in quantitative PCR, in both unchallenged and *Pe* infected flies (16 hours of infection). All the genes analysed showed a significant up-regulation after infection with *P. entomophila*, both in the mutant and in the control lines (Fig 4.6 and table 4.4). In contrast, no changes were found in the expression of *diptericin*, *upd3* and *vein* genes in flies overexpressing *CG13323* in the absence of *P. entomophila* infection (Fig 4.6 and table 4.4). These results failed to show any relationship of *CG13323* expression with the immune pathways.

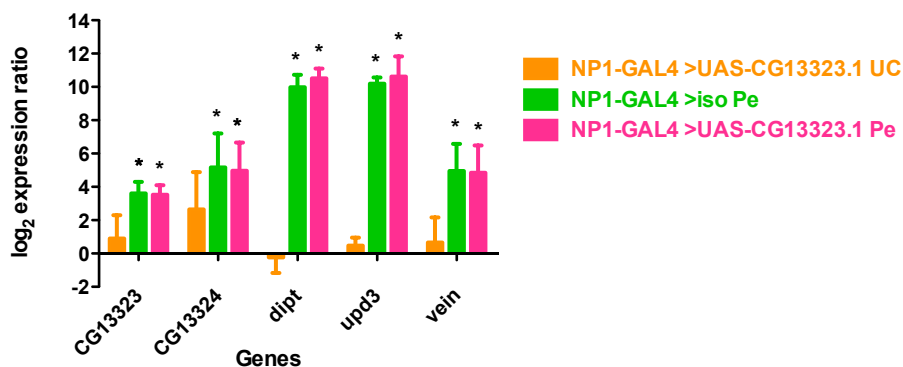


Figure 4.6 Relative expression of *repat* homologs and genes involved in the immune response. Asterisks denote changes in expression that are significantly different from the expression in the unchallenged NP1-GAL4> iso (t -test, p -value < 0.05). UC: unchallenged, Pe: *P. entomophila* infected.

Table 4.4 Relative expression values of *repat* homologs and genes involved in immune response.

	Unchallenged		<i>Pe</i> infected	
	UAS-CG13323.1>NP1-GAL4	iso>NP1-GAL4	iso>NP1-GAL4	UAS-CG13323.1>NP1-GAL4
<i>CG13323</i>	2,48 (1,21)		13,08 (3,39)*	12,08 (2,47)*
<i>CG13324</i>	10,59 (4,79)		59,91 (33,84)*	46,09 (24,44)*
<i>diptericin</i>	0,99 (0,40)		1104,55 (330,85)*	1534,24 (311,23)*
<i>upd3</i>	1,45 (0,29)		1200,40 (186,52)*	1931,10 (750,44)*
<i>vein</i>	2,17 (1,08)		48,17 (31,66)*	43,55 (26,43)*

Relative expression values are the mean \pm SEM from three experiments (N=15 guts each).

* Asterisks denote changes in expression that are significantly different from the expression in the unchallenged NP1-GAL4> iso (*t*-test, *p*-value <0.05).

6.4 Discussion

Repat genes have previously been described in response to pathogens and cell damage in *S. exigua* larvae (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010, Herrero, *et al.*, 2007) (Navarro-Cerrillo, *et al.*, 2012). Due to the lack of molecular tools in *S. exigua* and the identification of homologs in *D. melanogaster* (*CG13323* and *CG13324*), we decided to study the latter to obtain an approximation to the molecular function of this gene superfamily. In addition to the sequence homology, *CG13323* share some other characteristics with the *repat* family: it is expressed in gut, the predicted protein sequence has 112 amino acids, and it has been shown to be up-regulated in *Drosophila* adults infected with a bacterial strain (*Ecc15*) and the sigma virus (Buchon, *et al.*, 2009, Carpenter, *et al.*, 2009). Additionally, the characteristic motif 2 present in REPAT protein superfamily is also present in these two *Drosophila* genes.

To understand the molecular function of these genes, first it was necessary to test the survival phenotype of the different mutants. Survival assays revealed a higher percentage of survivors in the knock out mutants when in larval instar but not when adults. These results obtained in knock out larvae were completely opposite to the expected ones, due to the fact that the up-regulation occurs just after bacterial infection (Buchon, *et al.*, 2009, Carpenter, *et al.*, 2009). Due to lack of information on its possible molecular function, it would be probable that both genes have different roles in larvae and adults, what would be reflected in the survival results after a *P. entomophila* infection. Transgenic lines carrying UAS-*CG13323* were crossed with the NP1-GAL4 line for the specific expression of *CG13323* in the gut. In agreement with previous studies that showed up-regulation of *CG13323* and *CG13324* genes after *Ecc15* infection (Buchon, *et al.*, 2009), we observed that the over-expression of *CG13323* increased survival to *P. entomophila* infection. In addition, we observed a higher expression of *CG13323* and *CG13324* after *P. entomophila* infection than the one

described previously with the *Ecc15* infection. This could be due to differences in the bacterial pathogenicity, being *P. entomophila* a more virulent strain or to the presence of other virulence factors. More recently, Opota *et al.*, (2011) described that *P. entomophila* produces Monalysin, a pore forming toxin (PFT) that oligomerizes into ring-like structures to form pores in the membrane of target cells which lead to cell death. This strategy is similar to the one described for *B. thuringiensis* Cry toxins in the larval midgut of insects. Interestingly, the *repat* genes and their homologs in *Drosophila* increased their expression in the larval midgut after exposure to PFT. According to results of mutants over-expressing *CG13323* and previous expression studies, it would be expected that the knock out mutant showed decreased survival after infection with *P. entomophila*. Surprisingly, and in contrast with the expected results, larval knock out showed an increased survival to *P. entomophila* infection. This effect in the mutant larvae could be due to the fact that deletion is affecting all the tissues whereas the over-expression only occurs in gut, so this could reflect a different function in different tissues and thus explain the different phenotypes of survival. Nevertheless, we cannot rule out that the same effect on the survival of both mutants could be due to the function of these genes.

In an attempt to clarify the relationship between these genes and the immune response, we analysed the expression of some genes as markers of the three main immune pathways. For that reason, *diptericin* expression was used as reporter of the Imd pathway, *upd3* of the JAK-STAT pathway, and *vein* of the EGF pathway. As expected, *CG13323* and *CG13324* were up-regulated after infection with *P. entomophila*. In contrast, no differences were found in *diptericin*, *upd3* and *vein* expression in over-expressing lines, in both conditions: unchallenged and infected. This could be due either to the possibility that the gene acts down-stream of the genes selected as markers, that it is involved in other immune pathways (Toll, p38-MAPK, JNK), or respond to an independent mechanism. The function of *repat* genes and their homologs may depend on their cellular localization according to the finding that showed the REPAT1 nuclear translocation in the presence of REPAT8, a protein with which it interacts (Navarro-Cerrillo, *et al.*, 2012). In cellular localization studies, the UAS-*CG13323*GFP line was used to express *CG13323* fused to GFP in different cell lines (Takayuki Kuraishi, data not shown). The *CG13323*GFP signal was observed in the cytoplasm in muscular cells and mature enterocytes, but it was also observed in the nucleus of the adult midgut precursor cells. These cells have been described as responsible of epithelial renewal after damage by enteric pathogens (Buchon, *et al.*, 2009, Chatterjee, *et al.*, 2009, Cronin, *et al.*, 2009). This localization of *CG13323* could

be due to their specific function in stem cells and could have a relationship with the fact that REPAT1 from *S. exigua* showed nuclear localization only in the presence of a REPAT1-interacting protein, REPAT8.

In summary, we found homologous genes to *repat* from *S. exigua* in *D. melanogaster*: *CG13323* and *CG13324*. Their homology is based not only on their sequence, but also on their transcriptional pattern. *CG13323* and *CG13324* expression is gut specific and both are up-regulated after infection, similarly to *repat* genes. Mutant strains were generated to study the role of *repat* homologs in response to pathogens. Mutants with deletion of *CG13323* and *CG13324* showed an increased survival of larvae, whereas over-expressing mutants showed this increased survival in both adults and larvae. Despite the finding of a response to infection as an increase in the expression of marker genes of immune pathways, no information about the relationship of *CG13323* and *CG13324* with the immune response could be established. Further experiments using these mutant lines could clarify the role of these *repat* genes in the insect gut response to entomopathogen infection.

DISCUSIÓN GENERAL

Descripción de la superfamilia de genes *repat* en insectos.

Previamente a los estudios realizados durante esta tesis doctoral, se identificaron 4 genes por su elevada expresión en larvas de *S. exigua* en respuesta tanto a la exposición a toxinas Cry1Ca y Cry1A, como a la infección por baculovirus (Herrero, *et al.*, 2007). Al comienzo de esta tesis, se identificaron 3 nuevos genes *repat* al comparar la población de *S. exigua* resistente a Xentari™, un producto comercial basado en *B. thuringiensis*, con una población susceptible mediante experimentos de macrochips (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010). Estos tres nuevos genes se denominaron *repat5*, *repat6* y *repat7*. A continuación, mediante estudios de doble híbrido para la identificación de proteínas que interaccionan con REPAT1, se identificó un nuevo miembro de la familia: REPAT8 (Navarro-Cerrillo, *et al.*, 2012). Hasta el momento, la cantidad de miembros conocidos de esta familia de genes se había duplicado y sólo se habían descrito homólogos a *repat2* en otra especie cercana a *S. exigua*, *S. frugiperda*. Posteriormente, y una vez disponible el transcriptoma de *S. exigua*, se encontraron nuevas secuencias muy similares a las ya descritas para los genes *repat*. El estudio de estas secuencias ha permitido la identificación de un total de 46 genes *repat*, así como la identificación de una serie de motivos conservados a lo largo de la secuencia de aminoácidos.

El estudio filogenético de las secuencias nos ha permitido diferenciar dos clases principales de proteínas REPAT: α REPATs y β REPATs. Además, esta clasificación basada en el árbol filogenético se ve apoyada por la existencia de ciertos motivos característicos de los grupos establecidos. Todos los genes *repat* identificados previamente a la secuenciación del transcriptoma pertenecen a la clase de los α REPATs, en la cual hasta el momento sólo encontramos secuencias de especies estrechamente relacionadas: *Spodoptera spp.* y *Mamestra spp.* Concretamente, hasta el momento sólo se habían anotado homólogos a REPAT2 en dos especies de lepidóteros: *S. frugiperda* y *M. configurata*. Gracias a la identificación de los nuevos genes *repat* en el transcriptoma de *S. exigua* y al aumento de la cantidad de secuencias de otras especies de insectos disponibles en las bases de datos, se ha podido identificar secuencias homólogas a los genes *repat* en otras especies.

De entre los homólogos descritos en otras especies, encontramos tres más relevantes, bien porque se dispone información sobre su función o porque son genes de organismos modelo. Éstos son: HMG176 de *H. armigera*, MBF2 de *B. mori* y CG13323 de *D. melanogaster*. HMG176 se expresa en el intestino de *H. armigera* específicamente durante la muda de la larva (Wang, *et al.*, 2007). Mientras que los transcritos de *hmg176* se detectaron principalmente en las células columnares del intestino, las proteínas se detectaron dentro de la membrana de los cuerpos grasos y

en la membrana basal del intestino. Esta especificidad de tejido (intestino), así como un tamaño parecido a las proteínas REPAT (HMG176 tiene aproximadamente 19 kDa) apoyan la homología, no sólo a nivel de secuencia, sino también por estas otras características compartidas. Recientemente se han descrito proteínas HMG176 en otro lepidóptero, *M. configurata*. El otro homólogo del cual se dispone información es la proteína MBF2, descrita en *D. melanogaster*, *B. mori*, *Bombyx mandarina* y *Samia cynthia*. MBF2 es un coactivador que junto con otro coactivador, MBF1, media la activación transcripcional dependiente de FTZ-F1 (que es un regulador de unión a DNA) conectando este regulador a TATA y TFIIA (Li, *et al.*, 1997, Liu, *et al.*, 2000). MBF2 es una glicoproteína al igual que REPAT1 (Herrero *et al.*, 2007) y de tamaño similar (MBF2 expresado en células HeLa tiene un tamaño de unos 20 kDa) (Liu, *et al.*, 1998). Recientemente, se ha identificado una secuencia en *B. mori* con elevada homología a MBF2, llamada MBF2-R que se encuentra sobreexpresada tras la exposición a *E. coli* y *B. subtilis*, aunque no a *S. aureus* (Tanaka, *et al.*, 2010). Debido a que la exposición se producía empleando bacterias muertas y a que responde sólo a bacterias cuya composición de la pared celular se basa en peptidoglicanos de tipo ácido meso-diapimérico, hace pensar en la respuesta de este gen a la presencia de bacterias gram-negativas. El tercer homólogo que cabe destacar es *CG13323*, descrito en el organismo modelo *D. melanogaster*. El gen *CG13323*, así como también *CG13324*, presentan, además de homología a nivel de secuencia, ciertas características similares a los genes *repat* y las proteínas codificadas en ellos. Ambos genes muestran expresión específica de intestino y responden tras la infección con dos especies bacterianas, *Ecc15* (Buchon, *et al.*, 2009) y *P. entomophila*.

Función molecular de las proteínas REPAT

Con el fin de profundizar en el conocimiento sobre la posible función de estos genes, se realizó una búsqueda de posibles proteínas de intestino que pudiesen interactuar con REPAT1 mediante la metodología del doble híbrido en levaduras. En estos experimentos se identificó la interacción de REPAT1 con dos miembros de la misma familia: REPAT4 y REPAT8. Interesantemente, a pesar de la presencia de otros genes *repat* en la genoteca empleada en los experimentos, solo se encontró interacción de REPAT1 con estos dos miembros. Todo esto hace pensar que la interacción entre REPAT1 y otras proteínas REPAT se encuentra restringida a unas pocas combinaciones. Estudios de las secuencias de las proteínas no aportaron información sobre las posibles características en las secuencias que distinguen entre las proteínas REPAT que interactúan con REPAT1 y las que no son capaces de hacerlo.

La interacción física entre REPAT1 y REPAT8 se ha visto confirmada por su co-localización en cultivo celular, ya que además de su capacidad física de interactuar también coinciden espacialmente dentro de la célula. REPAT1 en ausencia de REPAT8, se encuentra localizado exclusivamente en el citoplasma celular. En cambio, REPAT1 en presencia de REPAT8, proteína con la que interactúa, se localiza también en el núcleo. Esta translocación nuclear de REPAT1 debida a su interacción con REPAT8 sugiere que realizan su función como dímeros en el núcleo. Las secuencias de aminoácidos predichas para las proteínas REPAT indican que son proteínas de pequeño tamaño, con una señal de secreción en la región amino terminal y la presencia de un motivo di-leucina en la posición del aminoácido 60, lo cual hace pensar en su localización citoplasmática. La célula eucariota tiene distintos compartimentos, lo cual permite la regulación de ciertos procesos por la distribución espacial de los diferentes componentes implicados en ellos. Para llevar a cabo esta regulación, el transporte de los diferentes componentes, es decir, tanto la exportación como la importación de proteínas y ácidos nucleicos a través de los poros, debe estar muy controlado. La importación al núcleo a través de la membrana nuclear se puede realizar de dos formas: de forma pasiva, cuando las proteínas son de bajo peso molecular (20-50 kDa), y de forma activa, transportándose aquellas proteínas que poseen señal de localización nuclear (NLS). Esta NLS es reconocida por una superfamilia de receptores de transporte (Karyoferinas), las cuales interactúan transitoriamente con el complejo del poro nuclear para el transporte de la molécula a la que se han unido (Pemberton, *et al.*, 2005). La translocación nuclear ha sido descrita como un mecanismo para regular la actividad de ciertas proteínas (Nakielny, *et al.*, 1999), así como la interacción entre factores de transcripción para la regulación de la expresión de los genes que están bajo su control (Mowen, *et al.*, 1998). Esto es lo que ocurre con MBF2, homólogo a los genes *repat*, que necesita la expresión simultánea de MBF1 y BmFTZ-F1 para su localización dentro del núcleo (Liu, *et al.*, 2000) y, en consecuencia, su función como coactivador. Además, experimentos adicionales no incluidos en esta tesis, utilizando la línea transgénica que expresa CG13323 fusionado a GFP, han permitido ver la localización celular de esta proteína homóloga a REPAT en distintos tipos celulares. Utilizando el sistema UAS-GAL4 para expresar CG13323 en distintos tipos celulares, se ha observado que la localización de CG13323 sólo es nuclear cuando se expresa en las células madre del intestino de *Drosophila*.

Papel de las proteínas REPAT en la fisiología del intestino

Estudiando las secuencias y los motivos conservados a lo largo de éstas, no se han encontrado indicios de su posible función molecular. Los primeros genes *repat* se

identificaron por su aumento de expresión tras la intoxicación con toxinas Cry1Ca y Cry1A, así como por la infección de baculovirus (Herrero, *et al.*, 2007). Durante el desarrollo de la presente tesis, mediante el estudio de la expresión de los ocho primeros genes *repat* en intestinos de larvas de *S. exigua* expuestas a diferentes tratamientos, se observó una sobreexpresión general de los genes *repat* sólo tras aquellos tratamientos capaces de producir cierto daño celular (Cry1Ca, Xentari™ y Bt cry-), pero no se observa ningún efecto cuando los tratamientos son con otras bacterias (*E. coli* y *Enterococcus spp.*). Este hecho muestra que la regulación de su expresión no sólo ocurre en presencia de toxinas Cry (también presentes en Xentari™), sino que parece responder más bien al daño celular y no a la presencia de bacterias en el intestino de la larva (Buchon, *et al.*, 2009, Beckage, 2008). Además, en *S. frugiperda* se han encontrado genes *repat* en intestinos de insecto expuestos tanto a Cry1C como a xenobióticos (Negre, *et al.*, 2006, Rodríguez-Cabrera, *et al.*, 2008), respondiendo así al daño producido en el intestino de la larva.

En esta tesis también se ha caracterizado la regulación de la expresión de los genes *repat* descritos en dos condiciones diferentes: tras la exposición con toxina Cry1Ca, que sabemos que produce la sobreexpresión de algunos de estos genes (Herrero, *et al.*, 2007), y la producida por la microbiota establecida en el intestino de las larvas en las condiciones de crecimiento que mantenemos en el laboratorio. Se ha observado que mientras que la toxina Cry1Ca produce un cambio general en la expresión de los genes *repat* analizados, la presencia de microbiota en el intestino no es capaz de producirlo. Interesantemente, los genes que mostraron una diferencia significativa tras la intoxicación con Cry1Ca pertenecen todos a la clase de los α REPAT. Es probable que en estudios futuros sobre la expresión de estos genes en el intestino de insectos sometidos a diferentes condiciones muestren la sobreexpresión de otros genes *repat*, pudiendo aportar más información sobre la posible función de esta superfamilia de genes en respuesta a agentes patogénicos.

El intestino de los insectos es una barrera que está en continuo contacto con microorganismos siendo la principal vía de entrada de los patógenos. El intestino de los lepidópteros está formado por tres tipos celulares: células madre, enterocitos o células columnares, y células globulares. Las células madre son las responsables de la renovación de las células dañadas y se ha descrito que aumentan en número tras la exposición a toxinas de *B. thuringiensis* simultáneamente a la reducción en la cantidad de células columnares (Baines, *et al.*, 2007, Hakim, *et al.*, 2009). Hemos estudiado la expresión de los diferentes genes *repat* en células madre del intestino en comparación con la expresión general de este tejido. Se observa un patrón de expresión diferencial tanto en células madre como en el intestino completo mostrando especificidad de

expresión según el tipo celular. La exposición a toxina Cry1Ca no produjo ningún cambio significativo en el patrón general de distribución de la expresión de los genes *repat*. Aunque el incremento de la microbiota en el intestino no modifica significativamente los niveles de expresión de los genes *repat* en el intestino completo, sí que produce un aumento en la expresión de ciertos genes *repat* en células madre. Estos genes podrían estar respondiendo en células madre como mecanismo de mantenimiento de la homeostasis del intestino en respuesta a la presencia de microbiota.

La proliferación celular ha sido descrita como un mecanismo de respuesta a agentes patógenos, sobretodo en adultos *D. melanogaster*, pero también en *Anopheles stephensi* y en cultivo celular de *H. virescens* (Buchon, *et al.*, 2009, Cronin, *et al.*, 2009, Loeb, *et al.*, 2001, Baton, *et al.*, 2007). Así, estudios con *Drosophila* han mostrado que tras la infección con *P. entomophila* se observa proliferación celular dependiente de dosis (Buchon, *et al.*, 2009), siendo esta bacteria entomopatógena productora de monalísina, una toxina formadora de poros similar a las toxinas Cry de *B. thuringiensis* (Opota, *et al.*, 2011). También se ha observado que la infección con *P. entomophila* produce renovación del epitelio intestinal de forma dependiente de dosis, mientras que *Ecc15* y *Serratia marcescens* sí producen esa respuesta tras la infección, así como también a la presencia de la microbiota intestinal (Buchon, *et al.*, 2009, Buchon, *et al.*, 2009, Cronin, *et al.*, 2009). Además, también se ha observado un aumento en el porcentaje de las células diferenciadas en cultivo celular de *H. virescens* después del tratamiento con toxina Cry1Ac (Loeb, *et al.*, 2001). Dado que ciertos genes *repat* se encuentran diferencialmente expresados en células madre, siendo éstas células las responsables de la proliferación celular que se ha descrito como mecanismo de respuesta tanto a infecciones como a la presencia de microbiota, cabría pensar en el papel de los genes *repat* en la proliferación celular. En cambio, cuando estudiamos la proliferación celular en el intestino de larvas de *S. exigua*, no observamos diferencias en la proliferación celular ni tras la exposición a toxina Cry1Ca ni por la presencia de la microbiota intestinal, como tampoco se observó anteriormente tras la exposición al producto comercial Xentari™ (basado en *B. thuringiensis*) (Hernandez-Martinez, *et al.*, 2010).

Los genes *repat* son genes que responden a agentes patógenos, aumentando su expresión tras la exposición de los insectos a éstos. Un mayor nivel de expresión de estos genes de respuesta podría contrarrestar el efecto del patógeno disminuyendo la eficacia de la infección. Esto se observó en infecciones con baculovirus que expresaban *repat1*, ya que estos virus resultaban menos virulentos (Herrero, *et al.*, 2007). En este estudio, esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que, en la

población resistente a un producto comercial basado en *B. thuringiensis* (Xentari™), cuatro genes *repat* mostraron una elevada expresión constitutiva en ausencia de exposición a Xentari™. Además, la expresión de uno de estos genes, *repat5*, mostró una correlación positiva con una menor susceptibilidad al producto Xentari™, siendo aquellas larvas con mayores valores de expresión de *repat5* las que presentaban un mayor crecimiento en presencia de Xentari™ en la dieta y, por lo tanto, una menor susceptibilidad al producto. Así pues, parece que la expresión de estos genes se ve regulada no sólo como mecanismo de respuesta a entomopatógenos sino que, además, podría estar implicada en la aparición de resistencias a éstos. Los estudios con *D. melanogaster* también mostraron un incremento en la expresión de *CG13323* en el intestino tras la infección, así como una mayor supervivencia por la sobreexpresión de *CG13323* en el intestino de la larva, frente a la infección con *P. entomophila*. Contrariamente, el mutante con la deficiencia de *CG13323* y *CG13324* también mostró un mayor fenotipo de resistencia a la infección en estadios larvarios. Este fenotipo similar en ambos mutantes podría deberse a la función molecular de estos genes o al hecho de que la deficiencia afecta a todos los tejidos mientras que la sobre-expresión se realizó específicamente en el tejido de interés para nuestro estudio: el intestino. Sin embargo, no se puede descartar que el mismo efecto de ambos tipos de mutantes podría deberse a la propia función de estos genes. Mediante el empleo de las líneas de sobreexpresión se estudió la influencia de *CG13323* sobre la expresión de algunos genes implicados en la respuesta inmune de *Drosophila*: *diptericina* de la ruta Imd, *upd3* de la ruta JAK-STAT y *vein* de la ruta EGF. No se encontraron cambios significativos en la expresión de estos genes debida a la sobreexpresión de *CG13323* en intestino. Este resultado podría deberse a que *CG13323* podría estar actuando sobre elementos posteriores de los genes usados como marcadores en dichas rutas, a que está implicado en alguna de las rutas que no hemos estudiado (Toll, p38-MAPK, JNK), o bien pertenecer a un mecanismo de respuesta diferente.

En resumen, durante el desarrollo de esta tesis el número de genes *repat* identificados ha aumentado de 4 a 46 miembros en *S. exigua*. El descubrimiento de nuevas secuencias ha permitido la identificación de homólogos en otras especies de insectos. Además, algunos genes *repat* han mostrado una mayor expresión tras la exposición a PFT, así como también en una población de *S. exigua* resistente a un producto comercial basado en *B. thuringiensis* (Xentari™). Los genes homólogos en *Drosophila* también han mostrado un aumento en su expresión tras la infección con *P. entomophila*, así como un aumento de la supervivencia debida a la sobreexpresión de *CG13323*. También se ha observado la interacción de REPAT1 con dos miembros de

la misma familia, REPAT4 y REPAT8. La interacción de REPAT1 y REPAT8 ha mostrado significado funcional debido al cambio de localización celular de REPAT1. El hecho de que existan tantos miembros de la familia, su diferente respuesta a nivel de expresión, su pequeño tamaño, la interacción entre miembros de la misma familia, así como su translocación nuclear cuando interaccionan entre sí, hace pensar en la posibilidad de que podrían actuar como factores de transcripción. De este modo, diferentes combinaciones de proteínas REPAT podrían ser responsables de la activación de la transcripción de genes implicados en distintos aspectos de la fisiología del insecto. Futuros estudios sobre las posibles combinaciones de proteínas REPAT capaces de interaccionar entre sí, así como el estudio de estas parejas, tanto en su localización celular, como su efecto sobre la expresión de diferentes genes implicados en rutas de respuesta inmune, aportarían información muy valiosa sobre la función de esta superfamilia de genes en el intestino de insectos.

CONCLUSIONES

1. La familia de genes *repat* está formada por al menos 46 miembros en *S. exigua* y no es exclusiva de esta especie. Se han encontrado secuencias homólogas en otras especies de insectos, destacando HMG176 de *H. armigera*, MBF2 de *B. mori*, e incluso en dípteros, como el gen *CG13323* de *D. melanogaster*.
2. Se han identificado 3 nuevos genes *repat* que presentan unos elevados niveles de expresión en una población de *S. exigua* resistente a *B. thuringiensis*. Los elevados niveles de expresión de uno de estos genes, *repat5*, se correlacionaron con la resistencia a Xentari™.
3. La proteína REPAT1 interacciona físicamente con dos miembros de la misma familia proteica: REPAT4 y REPAT8. La interacción de REPAT1 con REPAT8 conlleva al cambio de localización de REPAT1 en la célula y a su translocación al núcleo.
4. El análisis simultáneo de la expresión de los ocho primeros miembros de esta familia (*repat1 a repat8*) mostró que estos genes se sobreexpresaban en respuesta a los tratamientos relacionados con *B. thuringiensis* (toxina Cry1Ca, Xentari™ y Bt cry-).
5. El análisis global de la expresión de los genes *repat* de *S. exigua* muestra una sobreexpresión de los genes α *repat* en respuesta a la intoxicación con Cry1Ca de *B. thuringiensis* en el intestino. En cambio, no se observó respuesta de los genes *repat* al aumento de la microbiota en los intestinos de las larvas.
6. Análisis de la expresión diferencial en células madre del intestino mostraron una expresión dependiente del tipo celular para alguno de los genes estudiados. El patrón general de esta expresión diferencial no mostró grandes cambios tras la exposición a la toxina Cry1Ca pero sí por la presencia de microbiota en el intestino, mostrando una mayor cantidad de genes con elevada expresión en las células madre del intestino.
7. Tanto la exposición a toxina Cry1Ca, como la presencia de microbiota en el intestino, no produce cambios en la proliferación celular en el intestino de larvas de quinto estadio de *S. exigua*.

8. La sobreexpresión de *CG13323* (gen homólogo a *repat* en *D. melanogaster*) mostró un aumento en la supervivencia frente a la infección con *P. entomophila*, tanto en larvas como en adultos.

9. Debido a las características de los genes *repat*: la existencia de numerosos miembros de la misma familia, su diferente respuesta a nivel de expresión, el pequeño tamaño de las proteínas, la interacción entre miembros de la misma familia que produce su translocación nuclear, y el efecto de la sobreexpresión sobre la fisiología del insecto, sugieren la posibilidad de que diferentes combinaciones de proteínas REPAT podrían ser responsables de la activación de la transcripción de genes implicados en distintos aspectos de la fisiología del insecto.

1. The *repat* gene family consists of at least 46 members in *S. exigua* and it is not exclusive from this species. Homologous sequences have been found in other insect species, in particular HMG176 of *H. armigera*, MBF2 of *B. mori*, and even in Diptera, such as the CG13323 gene of *D. melanogaster*.
2. Three new *repat* genes have been identified due to their high levels of expression in a population of *S. exigua* resistant to *B. thuringiensis*. High levels of expression of one of these genes, *repat5*, correlated with resistance to Xentari™.
3. The REPAT1 protein physically interacts with two members of the same protein family: REPAT4 and REPAT8. The interaction of REPAT1 with REPAT8 leads to relocation of REPAT1 in the cell and its translocation to the nucleus.
4. The simultaneous expression analysis of the first eight members of this family (*repat1* to *repat8*) showed that these genes are over-expressed in response to *B. thuringiensis*-related treatments (Cry1Ca toxin, Xentari™ and Bt cry-).
5. The global analysis of *repat* gene expression in *S. exigua* showed an over-expression of *arepats* in response to the exposure to Cry1Ca toxin from *B. thuringiensis* in the larval midgut. In contrast, no response of *repat* genes was observed to the increase of microbiota in larval midguts.
6. Analysis of the differential expression in midgut stem cells showed a cell type-dependent expression for some of the genes studied. The general transcription profile of differential expression showed no significant changes after Cry1Ca toxin exposure but it did so by the presence of microbiota in the midgut, showing a greater number of genes with higher expression in midgut stem cells.
7. The exposure to toxin Cry1Ca, as well as the presence of microbiota in the midgut, does not produce changes in cell proliferation in midguts of *S. exigua* fifth instar larvae.
8. Overexpression of CG13323 (*repat* homologous gene in *D. melanogaster*) showed an increase in survival after *P. entomophila* infection, both in larvae and in adults.

9. Due to the characteristics of the *repat* genes: the occurrence of numerous members of the same family, different expression level response, the small size of the proteins, the interaction between members of the same family that produces nuclear translocation, and the effect of overexpression on the insect physiology, suggest the possibility that different combinations of REPAT proteins could be responsible for the activation of transcription of genes involved in various aspects of the insect physiology.

BIBLIOGRAFÍA

- Agaisse, H., Burrack, L. S., Philips, J. A., Rubin, E. J., Perrimon, N. and Higgins, D. E. (2005) Genome-wide RNAi screen for host factors required for intracellular bacterial infection. *Science*.309, 1248-51
- Agaisse, H. and Perrimon, N. (2004) The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol Rev*.198, 72-82
- Ahmad, A., Yadav, S.P., Asthana, N., Mitra, K.,Srivastava, S.P. and Ghosh, J.K. (2006) Utilization of an amphipatic leucine zipper sequence to design antibacterial peptides with simultaneous modulation of toxic activity against human red blood cells. *J. Biol. Chem.* 281: 22029-22038
- Akhurst, R.J. (1980) Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *Journal of General Microbiology*, 121, pp. 303–309
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*25, 3389-402
- Apidianakis, Y. and Rahme, L. G. (2011) *Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology. *Dis Model Mech*.4, 21-30
- Apoyolo, C., Drif, L., Vassal, M., de Barjac, H., Bossy, J., Leclant, F., and Frutos, R. (1995) Isolation of multiple subspecies of *Bacillus thuringiensis* from a population of the European sunflower moth, *Homoeosoma nebulella*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4343-4347
- Arakawa, T., Kato, Y., Hattori, M. and Yamakawa, M. (1996) Lipophorin: A carrier for lipids in insects participates in superoxide production un haemolymph plasma. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 403-409
- Aronson, A. I. and Shai, Y. (2001) Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol Lett.*195, 1-8
- Asgari, S. and Schmidt, O. (2004) Isolation of an imaginal disc growth factor homologue from *Pieris rapae* and its expression following parasitization by *Cotesia rubecula*. *J Insect Physiol.*50, 687-94
- Bailey, T. L. and Elkan, C. (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.*2, 28-36
- Baines, A. C. and Zhang, B. (2007) Receptor-mediated protein transport in the early secretory pathway. *Trends Biochem Sci.*32, 381-8
- Bang, K., Park, S., Yoo, J. Y. and Cho, S. (2012) Characterization and expression of *attacin*, an antibacterial protein-encoding gene, from the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hubner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). *Mol Biol Rep.* 39(5):5151-9
- Barbercheck, M.E. and Kaya, H.K. (1991) Competitive interactions between entomopathogenic nematodes and *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hypomycetes) in soilborne larvae of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Envirom. Entomol.* 20: 707712.

- Barboza-Corona, J. E., Vazquez-Acosta, H., Bideshi, D. K. and Salcedo-Hernandez, R. (2007) Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. Arch Microbiol.187, 117-26
- Barillas-Mury, C., Han, Y. S., Seeley, D. and Kafatos, F. C. (1999) *Anopheles gambiae* Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. EMBO J.18, 959-67
- Basset, A., Khush, R. S., Braun, A., Gardan, L., Boccard, F., Hoffmann, J. A. and Lemaitre, B. (2000) The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. Proc Natl Acad Sci U S A.97, 3376-81
- Baton, L. A. and Ranford-Cartwright, L. C. (2007) Morphological evidence for proliferative regeneration of the *Anopheles stephensi* midgut epithelium following *Plasmodium falciparum* ookinete invasion. J Invertebr Pathol.96, 244-54
- Beckage, N.E. (2008) Insect Immunology. Academic Press, Amsterdam.
- Belda, J., Justicia, L., Pascual, F., and Cabello, T. (1994) Distribución espacial de *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lep.; Noctuidae) en el cultivo de pimiento en invernadero. Bol. San. Veg. Plagas. 20: 287-301.
- Belvin, M. P. and Anderson, K. V. (1996) A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. Annu Rev Cell Dev Biol.12, 393-416
- Bielza, P. (2005) La resistencia a insecticidas: de los mecanismos a las estrategias de manejo. Phytoma Esp. 173: 36-38.
- Bischoff, V., Vignal, C., Boneca, I. G., Michel, T., Hoffmann, J. A. and Royet, J. (2004) Function of the *Drosophila* pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. Nat Immunol.5, 1175-80
- Blackburn, M. B., Loeb, M. J., Clark, E. and Jaffe, H. (2004) Stimulation of midgut stem cell proliferation by *Manduca sexta* alpha-arylphorin. Arch Insect Biochem Physiol.55, 26-32
- Blandin, S. and Levashina, E. A. (2004) Thioester-containing proteins and insect immunity. Mol Immunol.40, 903-8
- Blissard, G. W. (1996) Baculovirus--insect cell interactions. Cytotechnology.20, 73-93
- Bradley, D., Harkey, M. A., Kim, M. K., Biever, K. D. and Bauer, L. S. (1995) The insecticidal CryIB crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. J Invertebr Pathol.65, 162-73
- Brand, A.H. and Perrimon N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. Development. Jun;118(2):401-15.
- Brandt, S. M. and Schneider, D. S. (2007) Bacterial infection of fly ovaries reduces egg production and induces local hemocyte activation. Dev Comp Immunol.31, 1121-30
- Braunagel, S. C. and Summers, M. D. (1994) *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids: structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles. Virology.202, 315-28

- Bravo, A., Gill, S. S. and Soberon, M. (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*.49, 423-35
- Bravo, A., Gomez, I., Conde, J., Munoz-Garay, C., Sanchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S. S. and Soberon, M. (2004) Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta*.1667, 38-46
- Bravo, A., Jansens, S., and Peferoen, M. (1992) Inmunocytochemical Localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *J. Invertebr. Pathol.* 60: 237-246.
- Bravo, A. and Soberon, M. (2008) How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol.*26, 573-9
- Brey, P. T., Lee, W. J., Yamakawa, M., Koizumi, Y., Perrot, S., Francois, M. and Ashida, M. (1993) Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*.90, 6275-9
- Broderick, N. A., Raffa, K. F. and Handelsman, J. (2006) Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*.103, 15196-9
- Broderick, N. A., Robinson, C. J., McMahon, M. D., Holt, J., Handelsman, J. and Raffa, K. F. (2009) Contributions of gut bacteria to *Bacillus thuringiensis*-induced mortality vary across a range of Lepidoptera. *BMC Biol.*7, 11
- Buchon, N., Broderick, N. A., Chakrabarti, S. and Lemaitre, B. (2009) Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes Dev.*23, 2333-44
- Buchon, N., Broderick, N. A., Kuraishi, T. and Lemaitre, B. (2010) *Drosophila* EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. *BMC Biol.*8, 152
- Buchon, N., Broderick, N. A., Poidevin, M., Pradervand, S. and Lemaitre, B. (2009) *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation. *Cell Host Microbe*.5, 200-11
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L. and Hoffmann, D. (1999) Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol.*23, 329-44
- Caballero, P., Murillo, R., Muñoz, D. and Williams, T. (2009) El nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) como bioplaguicida: análisis de avances recientes en España. *Revista Colombiana de Entomología*. 35:105-111.
- Caballero, P., Williams, T. and López-Ferber, M. (2001) Estructura y taxonomía de los baculovirus. En: *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. Caballero, P., López-Ferber, M. & Williams, T. (eds.), pp. 15-46. Phytoma S.A., Valencia, España.
- Caballero, P., Zudeima, D., Santiago-Alvarez, C. and Vlak, M. (1992) Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Biocontrol Sci. Technol.* 2:145-157.
- Cabeen, M. T. and Jacobs-Wagner, C. (2005) Bacterial cell shape. *Nat Rev Microbiol.*3, 601-10

- Canavoso, L. E., Jouni, Z. E., Karnas, K. J., Pennington, J. E. and Wells, M. A. (2001) Fat metabolism in insects. *Annu Rev Nutr.*21, 23-46
- Cancino-Rodezno, A., Alexander, C., Villasenor, R., Pacheco, S., Porta, H., Pauchet, Y., Soberon, M., Gill, S. S. and Bravo, A. (2010) The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem Mol Biol.*40, 58-63
- Carpenter, J., Hutter, S., Baines, J. F., Roller, J., Saminadin-Peter, S. S., Parsch, J. and Jiggins, F. M. (2009) The transcriptional response of *Drosophila melanogaster* to infection with the sigma virus (Rhabdoviridae). *PLoS One.*4, e6838
- Cermenati, G., Corti, P., Caccia, S., Giordana, B. and Casartelli, M. (2007) A morphological and functional characterization of *Bombyx mori* larval midgut cells in culture. *GISJ* 4: 119-126
- Chamilos, G., Samonis, G. and Kontoyiannis, D. P. (2011) *Drosophila melanogaster* as a model host for the study of microbial pathogenicity and the discovery of novel antimicrobial compounds. *Curr Pharm Des.*17, 1246-53
- Charroux, B. and Royet, J. (2010) *Drosophila* immune response: From systemic antimicrobial peptide production in fat body cells to local defense in the intestinal tract. *Fly (Austin).*4, 40-7
- Chatterjee, M. and Ip, Y. T. (2009) Pathogenic stimulation of intestinal stem cell response in *Drosophila*. *J Cell Physiol.*220, 664-71
- Chatterjee, S., Sang, T. K., Lawless, G. M. and Jackson, G. R. (2009) Dissociation of tau toxicity and phosphorylation: role of GSK-3beta, MARK and Cdk5 in a *Drosophila* model. *Hum Mol Genet.*18, 164-77
- Cheng, T., Zhao, P., Liu, C., Xu, P., Gao, Z., Xia, Q. and Xiang, Z. (2006) Structures, regulatory regions, and inductive expression patterns of antimicrobial peptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Genomics.*87, 356-65
- Cheng, T. C., Zhang, Y. L., Liu, C., Xu, P. Z., Gao, Z. H., Xia, Q. Y. and Xiang, Z. H. (2008) Identification and analysis of Toll-related genes in the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. *Dev Comp Immunol.*32, 464-75
- Cheon, H. M., Shin, S. W., Bian, G., Park, J. H. and Raikhel, A. S. (2006) Regulation of lipid metabolism genes, lipid carrier protein lipophorin, and its receptor during immune challenge in the mosquito *Aedes aegypti*. *J Biol Chem.*281, 8426-35
- Chintapalli, V. R., Wang, J. and Dow, J. A. (2007) Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nat Genet.*39, 715-20
- Choe, K. M., Werner, T., Stoven, S., Hultmark, D. and Anderson, K. V. (2002) Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in *Drosophila*. *Science.*296, 359-62
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. and Dean, D. H. (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.*62, 807-13
- Cronin, S. J., Nehme, N. T., Limmer, S., Liegeois, S., Pospisilik, J. A., Schramek, D., Leibbrandt, A., Simoes Rde, M., Gruber, S., Puc, U., Ebersberger, I., Zoranovic, T., Neely, G.

- G., von Haeseler, A., Ferrandon, D. and Penninger, J. M. (2009) Genome-wide RNAi screen identifies genes involved in intestinal pathogenic bacterial infection. *Science*.325, 340-3
- Cuadrado, I.M. y Viñuela, E. (1998) Resistencia a los pesticidas en los cultivos hortícolas. Fundación para la Investigación Agraria en la Provincia de Almería, La Cañada, Almería, España. 212p.
- Daffre, S., Kylsten, P., Samakovlis, C. and Hultmark, D. (1994) The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Mol Gen Genet*.242, 152-62
- Damgaard, P. H. (1995) Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *FEMS Immunol Med Microbiol*.12, 245-50
- Damgaard, P. H. (2000) Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment, chapter 1.2. En Charles, J. F., Delécluse, A., Nielsen-Le Roux, C. (eds.), *Entomopathogenic bacteria : from laboratory to field application*.
- Damgaard, P. H., Larsen, H. D., Hansen, B. M., Bresciani, J. and Jorgensen, K. (1996) Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. *Lett Appl Microbiol*.23, 146-50
- De Gregorio, E., Spellman, P. T., Rubin, G. M. and Lemaitre, B. (2001) Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*.98, 12590-5
- de Lucca, A. J., Simonson, J. G. y Larson, A. D. (1981) *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. *Can. J. Microbiol*. 27: 865-870.
- de Maagd, R. A., Bakker, P., Staykov, N., Dukiandjiev, S., Stiekema, W. and Bosch, D. (1999) Identification of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III amino acid residues involved in insect specificity. *Appl Environ Microbiol*.65, 4369-74
- de Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N. and Schnepf, H. E. (2003) Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu Rev Genet*.37, 409-33
- de Maagd, R. A., Bravo, A. and Crickmore, N. (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet*.17, 193-9
- de Maagd, R., Kwa, M. S. G., Weemen-Hendriks, M., Stiekema, W., and Bosch, D. (2000) *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. *Appl. Environ. Microbiol*. 66: 1559-1563.
- Desphande, M. V. (1999) Mycopesticide production by fermentation: potentia and challenges. *Crit. Rev. Microbiol*.
- Dostert, C., Jouanguy, E., Irving, P., Troxler, L., Galiana-Arnoux, D., Hetru, C., Hoffmann, J. A. and Imler, J. L. (2005) The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nat Immunol*.6, 946-53
- Dow, J.A.T. (1986) Insect midgut function. *Adv. Physiol*. 19:187-328.

- Du, C., Martin, P. A. and Nickerson, K. W. (1994) Comparison of Disulfide Contents and Solubility at Alkaline pH of Insecticidal and Noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* Protein Crystals. *Appl Environ Microbiol.*60, 3847-53
- Ehler, L.E. (2007) Impact of native predators and parasites on *Spodoptera exigua*, an introduced pest of alfalfa hay in northern California. *Biocontrol* 52:323-338.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. and Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A.*95, 14863-8
- Eleftherianos, I., Gokcen, F., Felfoldi, G., Millichap, P. J., Trenczek, T. E., French-Constant, R. H. and Reynolds, S. E. (2007) The immunoglobulin family protein Hemolin mediates cellular immune responses to bacteria in the insect *Manduca sexta*. *Cell Microbiol.*9, 1137-47
- Espinasse, S., Chaufaux, J., Buisson, C., Perchat, S., Gohar, M., Bourguet, D. and Sanchis, V. (2003) Occurrence and linkage between secreted insecticidal toxins in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Curr Microbiol.*47, 501-7
- Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A. and Koziel, M. G. (1996) Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc Natl Acad Sci U S A.*93, 5389-94
- Federici, M. M., Venkat, K., Bam, N., Patel, K., Dal Monte, P. R., Fernie, B., Hensley, P., Carr, S., Baldoni, J., Truneh, A. and Erickson, J. (2003) Detection and consequences of recombinant protein isoforms: implications for biological potency. *Dev Biol (Basel)*.113, 53-7; discussion 113-4
- Fedhila, S., Buisson, C., Dussurget, O., Serror, P., Glomski, I. J., Liehl, P., Lereclus, D. and Nielsen-LeRoux, C. (2010) Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol.*103, 24-9
- Fernandez, L. E., Aimanova, K. G., Gill, S. S., Bravo, A. and Soberon, M. (2006) A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem J.*394, 77-84
- Ferrandon, D., Imler, J. L., Hetru, C. and Hoffmann, J. A. (2007) The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol.*7, 862-74
- Ferre, J. and Van Rie, J. (2002) Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol.*47, 501-33
- Ferre J, Van Rie J, and MacIntosh SC (2008) Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM). In *Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs* (Romeis J, Shelton AM and Kennedy GG, eds. Dordrecht: Springer Science and Business Media. pp 41–85.
- Forcada, C., Alcacer, E., Garcera, M. D., Tato, A. and Martinez, R. (1999) Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: proteolytic and SEM study of the larval midgut. *Arch Insect Biochem Physiol.*42, 51-63
- Fox, D. T. and Spradling, A. C. (2009) The *Drosophila* hindgut lacks constitutively active adult stem cells but proliferates in response to tissue damage. *Cell Stem Cell.*5, 290-7

- Franco-Rivera, A., Benintende, G., Cozzi, J., Baizabal-Aguirre, V. M., Valdez-Alarcon, J. J. and Lopez-Meza, J. E. (2004) Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina. *Antonie Van Leeuwenhoek*.86, 87-92
- Fredslund, J. and Lange, M. (2007) Primique: automatic design of specific PCR primers for each sequence in a family. *BMC Bioinformatics*.8, 369
- Freitak, D., Heckel, D. G. and Vogel, H. (2009) Bacterial feeding induces changes in immune-related gene expression and has trans-generational impacts in the cabbage looper (*Trichoplusia ni*). *Front Zool*.6, 7
- Freitak, D., Heckel, D. G. and Vogel, H. (2009) Dietary-dependent trans-generational immune priming in an insect herbivore. *Proc Biol Sci*.276, 2617-24
- Freitak, D., Wheat, C. W., Heckel, D. G. and Vogel, H. (2007) Immune system responses and fitness costs associated with consumption of bacteria in larvae of *Trichoplusia ni*. *BMC Biol*.5, 56
- Gahan, L. J., Gould, F. and Heckel, D. G. (2001) Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*.293, 857-60
- Galko, M. J. and Krasnow, M. A. (2004) Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. *PLoS Biol*.2, E239
- Gandhe, A. S., Janardhan, G. and Nagaraju, J. (2007) Immune upregulation of novel antibacterial proteins from silkmoths (Lepidoptera) that resemble lysozymes but lack muramidase activity. *Insect Biochem Mol Biol*.37, 655-66
- García del Pino, F. and Morton, A. (2008) Efficacy of *Steinernema feltiae* against the leek moth *Acrolepiopsis assectella* in laboratory and field conditions. *BioControl* 53 (4), 643-650
- García Mari, F., Costa Comelles, J. and Ferragut Perez, F. (1994). *Las plagas agrícolas*. Ed.: Agripubli S.A. (phytoma – españa). Valencia
- Gaugler, R. (2006) *Entomopathogenic Nematology*. CAB International.
- Gaviria Rivera, A. M., Granum, P. E. and Priest, F. G. (2000) Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett*.190, 151-5
- Gho, H. K., Choi, J. S., and Uhm, K. B. (1993) Seasonal fluctuation of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner), adults and larvae. *Journal of Applied Entomology*. 32: 389-394
- Gietz, R. D. and Woods, R. A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*.350, 87-96
- Gill, S. S., Cowles, E. A. and Pietrantonio, P. V. (1992) The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu Rev Entomol*.37, 615-36
- Golic, K. G. and Golic, M. M. (1996) Engineering the *Drosophila* genome: chromosome rearrangements by design. *Genetics*.144, 1693-711
- Gomez, I., Miranda-Rios, J., Rudino-Pinera, E., Oltean, D. I., Gill, S. S., Bravo, A. and Soberon, M. (2002) Hydropathic 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, 30137-43
- Goto, A., Kadowaki, T. and Kitagawa, Y. (2003) *Drosophila hemolectin* gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. *Dev Biol.*264, 582-91
- Gottar, M., Gobert, V., Michel, T., Belvin, M., Duyk, G., Hoffmann, J. A., Ferrandon, D. and Royet, J. (2002) The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature.*416, 640-4
- Griffitts, J. S., Haslam, S. M., Yang, T., Garczynski, S. F., Mulloy, B., Morris, H., Cremer, P. S., Dell, A., Adang, M. J. and Aroian, R. V. (2005) Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science.*307, 922-5
- Griffitts, J. S., Whitacre, J. L., Stevens, D. E. and Aroian, R. V. (2001) Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. *Science.*293, 860-4
- Gunning, R. V., Dang, H. T., Kemp, F. C., Nicholson, I. C. and Moores, G. D. (2005) New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Appl Environ Microbiol.*71, 2558-63
- Hakim, R. S., Baldwin, K. and Smagghe, G. (2010) Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annu Rev Entomol.*55, 593-608
- Hakim, R. S., Blackburn, M. B., Corti, P., Gelman, D. B., Goodman, C., Elsen, K., Loeb, M. J., Lynn, D., Soin, T. and Smagghe, G. (2007) Growth and mitogenic effects of arylphorin in vivo and in vitro. *Arch Insect Biochem Physiol.*64, 63-73
- Hakim, R. S., Caccia, S., Loeb, M. and Smagghe, G. (2009) Primary culture of insect midgut cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*45, 106-10
- Hansen, B. J. and Salameh, S. (2000) Virulence of *Bacillus thuringiensis*, chapter 1.3. En Charles, J. F., Delécluse, A., Nielsen-Le Roux, C. (eds.), *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Hengen, P. N. (1997) False positives from the yeast two-hybrid system. *Trends Biochem Sci.*22, 33-4
- Hernandez-Martinez, P., Ferre, J. and Escriche, B. (2008) Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol.*97, 245-50
- Hernandez-Martinez, P., Naseri, B., Navarro-Cerrillo, G., Escriche, B., Ferre, J. and Herrero, S. (2010) Increase in midgut microbiota load induces an apparent immune priming and increases tolerance to *Bacillus thuringiensis*. *Environ Microbiol.*12, 2730-7
- Hernandez-Martinez, P., Navarro-Cerrillo, G., Caccia, S., de Maagd, R. A., Moar, W. J., Ferre, J., Escriche, B. and Herrero, S. (2010) Constitutive activation of the midgut response to *Bacillus thuringiensis* in Bt-resistant *Spodoptera exigua*. *PLoS One*, 5 (9), pii:e12795.
- Hernandez-Rodriguez, C. S., Ferre, J. and Herrero, S. (2009) Genomic structure and promoter analysis of pathogen-induced repeat genes from *Spodoptera exigua*. *Insect Mol Biol.*18, 77-85

- Herrero, S., Ansems, M., Van Oers, M. M., Vlak, J. M., Bakker, P. L. and de Maagd, R. A. (2007) REPAT, a new family of proteins induced by bacterial toxins and baculovirus infection in *Spodoptera exigua*. *Insect Biochem Mol Biol.*37, 1109-18
- Herrero, S., Gechev, T., Bakker, P. L., Moar, W. J. and de Maagd, R. A. (2005) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. *BMC Genomics.*6, 96
- Herrero, S., Gonzalez-Cabrera, J., Ferre, J., Bakker, P. L. and de Maagd, R. A. (2004) Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. *Biochem J.*384, 507-13
- Hoffmann, J. A. (2003) The immune response of *Drosophila*. *Nature.*426, 33-8
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. and Ezekowitz, R. A. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science.*284, 1313-8
- Honda, T., Shiba, A., Seo, S., Yamamoto, J., Matsuyama, J. and Miwatani, T. (1991) Identity of hemolysins produced by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett.*63, 205-9
- Honma, T. and Goto, K. (2001) Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature.*409, 525-9
- Hoover, K., Washburn, J. O. and Volkman, L. E. (2000) Midgut-based resistance of *Heliothis virescens* to baculovirus infection mediated by phytochemicals in cotton. *J Insect Physiol.*46, 999-1007
- Hua, G., Zhang, R., Abdullah, M. A. and Adang, M. J. (2008) *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. *Biochemistry.*47, 5101-10
- Huang, L., Cheng, T., Xu, P., Cheng, D., Fang, T. and Xia, Q. (2009) A genome-wide survey for host response of silkworm, *Bombyx mori* during pathogen *Bacillus bombyseptieus* infection. *PLoS One.*4, e8098
- Huffman, D. L., Abrami, L., Sasik, R., Corbeil, J., van der Goot, F. G. and Aroian, R. V. (2004) Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*101, 10995-1000
- Huffman, D. L., Bischof, L. J., Griffiths, J. S. and Aroian, R. V. (2004) Pore worms: using *Caenorhabditis elegans* to study how bacterial toxins interact with their target host. *Int J Med Microbiol.*293, 599-607
- Hultmark, D. (1996) Insect lysozymes. *EXS.*75, 87-102
- Hwang, J. and Kim, Y. (2011) RNA interference of an antimicrobial peptide, gloverin, of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, enhances susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol.*108, 194-200
- Imler, J. L. and Bulet, P. (2005) Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Chem Immunol Allergy.*86, 1-21

Iriarte, J. and Caballero, P. (2001) Biología y ecología de *Bacillus thuringiensis*, pp. 15-44. En Caballero, P. and Ferré, J. (eds.), Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de plagas. PHYTOMA-España-Universidad de Navarra.

Iriarte, J., Porcar, M., Lecadet, M. M., and Caballero, C. (2000) Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* from aquatic environments in Spain. *Curr. Microbiol.* 40: 402-408.

Jakubowska, A. K., Caccia, S., Gordon, K. H., Ferre, J. and Herrero, S. (2010) Downregulation of a chitin deacetylase-like protein in response to baculovirus infection and its application for improving baculovirus infectivity. *J Virol.*84, 2547-55

Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., Theilmann, D. A., Thiem, S. M. and Vlak, J. M. (2006) On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch Virol.*151, 1257-66

Ji, D. and Kim, Y. (2004) An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits the expression of an antibacterial peptide, cecropin, of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J Insect Physiol.*50, 489-96

Jiang, H. and Edgar, B. A. (2009) EGFR signaling regulates the proliferation of *Drosophila* adult midgut progenitors. *Development.*136, 483-93

Jiang, H., Grenley, M. O., Bravo, M. J., Blumhagen, R. Z. and Edgar, B. A. (2011) EGFR/Ras/MAPK signaling mediates adult midgut epithelial homeostasis and regeneration in *Drosophila*. *Cell Stem Cell.*8, 84-95

Jiang, H., Patel, P. H., Kohlmaier, A., Grenley, M. O., McEwen, D. G. and Edgar, B. A. (2009) Cytokine/Jak/Stat signaling mediates regeneration and homeostasis in the *Drosophila* midgut. *Cell.*137, 1343-55

Jimenez-Juarez, N., Munoz-Garay, C., Gomez, I., Gill, S. S., Soberon, M. and Bravo, A. (2008) The pre-pore from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is necessary to induce insect death in *Manduca sexta*. *Peptides.*29, 318-23

Jurat-Fuentes, J. L. and Adang, M. J. (2004) Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur J Biochem.*271, 3127-35

Jurat-Fuentes, J. L., Gahan, L. J., Gould, F. L., Heckel, D. G. and Adang, M. J. (2004) The HevCaLP protein mediates binding specificity of the Cry1A class of *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Biochemistry.*43, 14299-305

Kanost, M. R., Jiang, H. and Yu, X. Q. (2004) Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunol Rev.*198, 97-105

Kao, C.W. y Tsai, Y.S. (1989) Control of beet armyworm with entomopathogenic fungi. *Chin. J. Entomol.* 4: 214-224.

Kato, S., Matsumoto, T., Kawano, H., Sato, T. and Takeyama, K. (2004) Function of androgen receptor in gene regulations. *J Steroid Biochem Mol Biol.*89-90, 627-33

Kaur, S. (2000) Molecular approaches towards development of novel *Bacillus thuringiensis* biopesticides. *World J. Microbiol. Biotech.* 16: 781-793.

- Kaya, H.K. and Gaugler, R. (1993) Entomopathogenic nematodes. Annual Review of Entomology, 38 (1993), pp. 181–206
- Khush, R. S., Leulier, F. and Lemaitre, B. (2002) Immunology. Pathogen surveillance--the flies have it. Science.296, 273-5
- Kim, G.S. and Kim, Y. (2010) Up-regulation of circulating hemocyte population in response to bacterial challenge is mediated by octopamine and 5-hydroxytryptamine via Rac1 signal in *Spodoptera exigua*. J Insect Physiol. Jun;56(6):559-66.
- Kim, Y. S., Ryu, J. H., Han, S. J., Choi, K. H., Nam, K. B., Jang, I. H., Lemaitre, B., Brey, P. T. and Lee, W. J. (2000) Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells. J Biol Chem.275, 32721-7
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol.16, 111-20
- Kleino, A., Valanne, S., Ulvila, J., Kallio, J., Myllymaki, H., Enwald, H., Stoven, S., Poidevin, M., Ueda, R., Hultmark, D., Lemaitre, B. and Ramet, M. (2005) Inhibitor of apoptosis 2 and TAK1-binding protein are components of the *Drosophila* Imd pathway. EMBO J.24, 3423-34
- Knight, P. J., Crickmore, N. and Ellar, D. J. (1994) The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. Mol Microbiol.11, 429-36
- Knight, P. J., Knowles, B. H. and Ellar, D. J. (1995) Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin. J Biol Chem.270, 17765-70
- Koizumi, N., Imamura, M., Kadotani, T., Yaoi, K., Iwahana, H. and Sato, R. (1999) The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm *Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains. FEBS Lett.443, 139-43
- Koller, C. N., Bauer, L. S. and Hollingworth, R. M. (1992) Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. san diego native delta-endotoxin crystals. Biochem Biophys Res Commun.184, 692-9
- Kraaijeveld, A. R. and Godfray, H. C. (1997) Trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. Nature.389, 278-80
- Krem, M. M. and Di Cera, E. (2002) Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. Trends Biochem Sci.27, 67-74
- Kurtz, J. and Franz, K. (2003) Innate defence: evidence for memory in invertebrate immunity. Nature.425, 37-8
- Lagueux, M., Perrodou, E., Levashina, E. A., Capovilla, M. and Hoffmann, J. A. (2000) Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A.97, 11427-32

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*.23, 2947-8

Ladendorff, N.E. and Kanost, M.R. (1991) Bacteria-induced protein P4 (hemolin) from *Manduca sexta*: a member of the immunoglobulin superfamily which can inhibit hemocyte aggregation. *Arch Insect Biochem Physiol.*;18(4):285-300.

Lasa, R. (2007) Formulation and efficacy of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus as a biological insecticide for beet armyworm control in greenhouses of southern Spain. Tesis doctoral, Departamento de Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, Pamplona, España.

Lasa, R., Williams, T. and Caballero, P. (2008) Insecticidal properties and microbial contaminants in a *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (Baculoviridae) formulation stored at different temperatures. *J Econ Entomol.*101, 42-9

Lavine, M.D. and Strand, M.R. (2002) Insect hemocytes and their role in cellular immune responses. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1237-1242

Lee, K. Y., Horodyski, F. M., Valaitis, A. P. and Denlinger, D. L. (2002) Molecular characterization of the insect immune protein hemolin and its high induction during embryonic diapause in the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Insect Biochem Mol Biol.*32, 1457-67

Lee, W. J., Lee, J. D., Kravchenko, V. V., Ulevitch, R. J. and Brey, P. T. (1996) Purification and molecular cloning of an inducible gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*93, 7888-93

Lehane, M. J. (1997) Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol.*42, 525-50

Lemaitre, B. and Hoffmann, J. (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol.*25, 697-743

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.*86, 973-83

Lemaitre, B., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1997) *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.*94, 14614-9

Leulier, F., Rodriguez, A., Khush, R. S., Abrams, J. M. and Lemaitre, B. (2000) The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist gram-negative bacterial infection. *EMBO Rep.*1, 353-8

Leulier, F., Vidal, S., Saigo, K., Ueda, R. and Lemaitre, B. (2002) Inducible expression of double-stranded RNA reveals a role for dFADD in the regulation of the antibacterial response in *Drosophila* adults. *Curr Biol.*12, 996-1000

Levashina, E. A., Ohresser, S., Lemaitre, B. and Imler, J. L. (1998) Two distinct pathways can control expression of the gene encoding the *Drosophila* antimicrobial peptide *metchnikowin*. *J Mol Biol.*278, 515-27

Li, X., Schuler, M.A. and Berenbaum, M.R. (2006) Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol* 52: 231–253.

- Li, F. Q., Takemaru, K., Goto, M., Ueda, H., Handa, H. and Hirose, S. (1997) Transcriptional activation through interaction of MBF2 with TFIIA. *Genes Cells*.2, 143-53
- Li, L. and Fallon, A. M. (2006) Mosquito ribosomal protein S3 lacks a critical glutamine residue associated with DNA repair activity in homologous *Drosophila* proteins. *Arch Insect Biochem Physiol*.63, 188-96
- Li, Y., Zhao, L. and Wu, T. (1996) [Study on the test and evaluation of the toxicity of the strains preparation of the different subspecies of *Bacillus thuringiensis* and on the research into its standardization]. *Wei Sheng Wu Xue Bao*.36, 138-43
- Liburd, O. E., Funderburk, J. E., and Olson, S. M. (2000) Effect of biological and chemical insecticides on *Spodoptera* species (Lep., Noctuidae) and marketable yields of tomatoes. *J. Appl. Ent.* 124: 19-25.
- Liehl, P., Blight, M., Vodovar, N., Boccard, F. and Lemaitre, B. (2006) Prevalence of local immune response against oral infection in a *Drosophila/Pseudomonas* infection model. *PLoS Pathog*.2, e56
- Little, T. J. and Kraaijeveld, A. R. (2004) Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends Ecol Evol*.19, 58-60
- Liu, Y. B., Tabashnik, B. E., Puzsai-Carey, M. (1996) Field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 89: 798-804.
- Liu, Q. X., Ueda, H. and Hirose, S. (1998) Comparison of sequences of a transcriptional coactivator MBF2 from three Lepidopteran species *Bombyx mori*, *Bombyx mandarina* and *Samia cynthia*. *Gene*.220, 55-9
- Liu, Q. X., Ueda, H. and Hirose, S. (2000) MBF2 is a tissue- and stage-specific coactivator that is regulated at the step of nuclear transport in the silkworm *Bombyx mori*. *Dev Biol*.225, 437-46
- Loeb, M. J., Martin, P. A., Narang, N., Hakim, R. S., Goto, S. and Takeda, M. (2001) Control of life, death, and differentiation in cultured midgut cells of the lepidopteran, *Heliothis virescens*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*.37, 348-52
- Loeb, M.J., Martin, P.A., Hakim, R.S., Goto, S. and Takeda, M. (2001) Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. *J Insect Physiol* 47: 599–606.
- Ma, G., Roberts, H., Sarjan, M., Featherstone, N., Lahnstein, J., Akhurst, R. and Schmidt, O. (2005) Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae? *Insect Biochem Mol Biol*.35, 729-39
- Malais, M.H. and Ravensberg, W.J. (2006) Conocer y reconocer. Las plagas de cultivos protegidos y sus enemigos naturales. Reed Business Information. Koppert ed. Netherland.
- Mansfield, B. E., Dionne, M. S., Schneider, D. S. and Freitag, N. E. (2003) Exploration of host-pathogen interactions using *Listeria monocytogenes* and *Drosophila melanogaster*. *Cell Microbiol*.5, 901-11

- Martinez-Ramirez, A.C., Gould, F. and Ferre J (1999) Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera:Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A Crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Biocontrol Science and Technology* 9: 239–246.
- Mascarrenhas, V.J., Graves, J.B., Leonard, B.R. and Burris, E. (1998) Susceptibility of field populations of beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to commercial and experimental insecticides. *J. Econ. Entomol.* 91:827-833
- Matsuyama, J., Yamamoto, K., Miwatani, T. and Honda, T. (1995) Monoclonal antibody developed against a hemolysin of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Immunol.*39, 619-22
- Matsuzaki, K. (2009) Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788, 1687-1692
- McGaughey, W. H. (1985) Insect Resistance to the Biological Insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science.*229, 193-5
- Meadows, M. P., Ellis, D. J., Butt, J., Jarrett, P. and Burges, H. D. (1992) Distribution, Frequency, and Diversity of *Bacillus thuringiensis* in an Animal Feed Mill. *Appl Environ Microbiol.*58, 1344-50
- Mengin-Lecreulx, D. and Lemaitre, B. (2005) Structure and metabolism of peptidoglycan and molecular requirements allowing its detection by the *Drosophila* innate immune system. *J Endotoxin Res.*11, 105-11
- Meunier, L., Prefontaine, G., Van Munster, M., Brousseau, R. and Masson, L. (2006) Transcriptional response of *Choristoneura fumiferana* to sublethal exposure of Cry1Ab protoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Mol Biol.*15, 475-83
- Moar, W. J., Masson, L., Brousseau, R. and Trumble, J. T. (1990) Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni* of individual P1 protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* HD-1 and NRD-12. *Appl Environ Microbiol.*56, 2480-3
- Moar, W. J., Pusztai-Carey, M., Van Faassen, H., Bosch, D., Frutos, R., Rang, C., Luo, K. and Adang, M. J. (1995) Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC Resistance by *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl Environ Microbiol.*61, 2086-92
- Moret, Y. and Schmid-Hempel, P. (2000) Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. *Science.*290, 1166-8
- Moulton, J.k., Pepper, D.A., Jansson, R.K. and Dennehy, T.J. (2002) pro-active management of beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to tebufenozide and methoxyfenozide: Baseline monitoring, risk assessment, and isolation of resistance. *J. Econ. Entomol.* 95:414-424
- Moulton, J.k., Pepper, D.A., Dennehy, T.J., Dugger, P. and Richter, D. (1999) Studies of resistance fo beet armyworm (*Spodoptera exigua*) to spinosad in field populations from the southern USA and southeast Asia. *Proceedings of Beltwide Cotton Conferences.* Orlando, FL, USA 2:884-887
- Mowen, K. and David, M. (1998) Role of the STAT1-SH2 domain and STAT2 in the activation and nuclear translocation of STAT1. *J Biol Chem.*273, 30073-6

- Muñoz, D. y Caballero, P. (200) Persistence and effects of parasitic genotypes in a mixed population of the *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus. *Biol. Control* 19 259-264
- Murillo, R., Munoz, D., Williams, T., Mugeta, N. and Caballero, P. (2006) Application of the PCR-RFLP method for the rapid differentiation of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus genotypes. *J Virol Methods*.135, 1-8
- Nakielny, S. and Dreyfuss, G. (1999) Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell*.99, 677-90
- Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F. and Carton, Y. (1995) Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *Eur J Cell Biol*.68, 450-6
- Navarro-Cerrillo, G., Ferre, J., de Maagd, R. A. and Herrero, S. (2012) Functional interactions between members of the REPAT family of insect pathogen-induced proteins. *Insect Mol Biol*. doi: 10.1111/j.1365-2583.2012.01139.x
- Negre, V., Hotelier, T., Volkoff, A. N., Gimenez, S., Cousserans, F., Mita, K., Sabau, X., Rocher, J., Lopez-Ferber, M., d'Alencon, E., Audant, P., Sabourault, C., Bidegainberry, V., Hilliou, F. and Fournier, P. (2006) SPODOBASE: an EST database for the lepidopteran crop pest *Spodoptera*. *BMC Bioinformatics*.7, 322
- Nordahl Petersen, T., Brunak, S., von Heijne, G. and Nielsen, H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8:785-786
- Ohba, M. and Aratake, Y. (1994) Comparative study of the frequency and flagellar serotype flora of *Bacillus thuringiensis* in soils and silkworm-breeding environments. *J. Appl. Bacteriol*. 76: 203-209.
- Ochiai, M. and Ashida, M. (1988) Purification of a beta-1,3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem*.263, 12056-62
- Ochoa-Campuzano, C., Real, M. D., Martinez-Ramirez, A. C., Bravo, A. and Rausell, C. (2007) An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*.362, 437-42
- Ohta, M., Watanabe, A., Mikami, T., Nakajima, Y., Kitami, M., Tabunoki, H., Ueda, K. and Sato, R. (2006) Mechanism by which *Bombyx mori* hemocytes recognize microorganisms: direct and indirect recognition systems for PAMPs. *Dev Comp Immunol*.30, 867-77
- Opota, O., Vallet-Gely, I., Vincentelli, R., Kellenberger, C., Iacovache, I., Gonzalez, M. R., Roussel, A., van der Goot, F. G. and Lemaitre, B. (2011) Monalysin, a novel ss-pore-forming toxin from the *Drosophila* pathogen *Pseudomonas entomophila*, contributes to host intestinal damage and lethality. *PLoS Pathog*.7, e1002259
- Oppert, B., Hammel, R., Throne, J. E., and Kramer, K. J. (2000). Fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. *Entomol. Exp. Appl*. 96: 281-287.
- Oppert, B., Kramer, K. J., Beeman, R. W., Johnson, D. and McGaughey, W. H. (1997) Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J Biol Chem*.272, 23473-6

- Oppert, B., Kramer, K. J., Johnson, D. E., MacIntosh, S. C. and McGaughey, W. H. (1994) Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. *Biochem Biophys Res Commun.*198, 940-7
- Pacheco, S., Gomez, I., Arenas, I., Saab-Rincon, G., Rodriguez-Almazan, C., Gill, S. S., Bravo, A. and Soberon, M. (2009) Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a "ping pong" binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. *J Biol Chem.*284, 32750-7
- Pandey, U. B. and Nichols, C. D. (2011) Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol Rev.*63, 411-36
- Park, Y. and Kim, Y. (2000) Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophilus*, the symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *J Insect Physiol.*46, 1469-1476
- Parks, A. L., Cook, K. R., Belvin, M., Dompe, N. A., Fawcett, R., Huppert, K., Tan, L. R., Winter, C. G., Bogart, K. P., Deal, J. E., Deal-Herr, M. E., Grant, D., Marcinko, M., Miyazaki, W. Y., Robertson, S., Shaw, K. J., Tabios, M., Vysotskaia, V., Zhao, L., Andrade, R. S., Edgar, K. A., Howie, E., Killpack, K., Milash, B., Norton, A., Thao, D., Whittaker, K., Winner, M. A., Friedman, L., Margolis, J., Singer, M. A., Kopczynski, C., Curtis, D., Kaufman, T. C., Plowman, G. D., Duyk, G. and Francis-Lang, H. L. (2004) Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nat Genet.*36, 288-92
- Pascual, L., Jakubowska, A.K., Blanca, J.M., Cañizares, J., Ferre, J., Gloeckner, G., Vogel, H, and Herrero, S. (2012) The transcriptome of *Spodoptera exigua* larvae exposed to different types of microbes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. En prensa
- Pearson, A. M., Baksa, K., Ramet, M., Protas, M., McKee, M., Brown, D. and Ezekowitz, R. A. (2003) Identification of cytoskeletal regulatory proteins required for efficient phagocytosis in *Drosophila*. *Microbes Infect.*5, 815-24
- Pemberton, L. F. and Paschal, B. M. (2005) Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic.*6, 187-98
- Perez, C., Munoz-Garay, C., Portugal, L. C., Sanchez, J., Gill, S. S., Soberon, M. and Bravo, A. (2007) *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. *Cell Microbiol.*9, 2931-7
- Pérez, C. J. and Shelton, A. M. (1997) Resistance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* Berlinier in Central America. *J. Econ. Entomol.* 90: 87-93.
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*29, e45
- Phillips, J. A., Rubin, E. J. and Perrimon, N. (2005) *Drosophila* RNAi screen reveals CD36 family member required for mycobacterial infection. *Science.*309, 1251-3
- Pigott, C. R. and Ellar, D. J. (2007) Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev.*71, 255-81
- Pili-Floury, S., Leulier, F., Takahashi, K., Saigo, K., Samain, E., Ueda, R. and Lemaitre, B. (2004) In vivo RNA interference analysis reveals an unexpected role for GGBP1 in the defense against Gram-positive bacterial infection in *Drosophila* adults. *J Biol Chem.*279, 12848-53

- Priest, F. G., Barker, M., Baillie, L. W., Holmes, E. C. and Maiden, M. C. (2004) Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol.*186, 7959-70
- Ragab, A., Buechling, T., Gesellchen, V., Spirohn, K., Boettcher, A. L. and Boutros, M. (2011) *Drosophila* Ras/MAPK signalling regulates innate immune responses in immune and intestinal stem cells. *EMBO J.*30, 1123-36
- Rahman, M. M., Roberts, H. L., Sarjan, M., Asgari, S. and Schmidt, O. (2004) Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*101, 2696-9
- Ramet, M., Manfruelli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B. and Ezekowitz, R. A. (2002) Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature.*416, 644-8
- Ramet, M., Pearson, A., Manfruelli, P., Li, X., Koziel, H., Gobel, V., Chung, E., Krieger, M. and Ezekowitz, R. A. (2001) *Drosophila* scavenger receptor CI is a pattern recognition receptor for bacteria. *Immunity.*15, 1027-38
- Rausell, C., Garcia-Robles, I., Sanchez, J., Munoz-Garay, C., Martinez-Ramirez, A. C., Real, M. D. and Bravo, A. (2004) Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Biochim Biophys Acta.*1660, 99-105
- Rausell, C., Munoz-Garay, C., Miranda-CassoLuengo, R., Gomez, I., Rudino-Pinera, E., Soberon, M. and Bravo, A. (2004) Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. *Biochemistry.*43, 166-74
- Reichhart JM. (2005) Tip of another iceberg: *Drosophila* serpins. *Trends Cell Biol.* 2005 Dec;15(12):659-65.
- Rivkin, H., Kroemer, J. A., Bronshtein, A., Belausov, E., Webb, B. A. and Chejanovsky, N. (2006) Response of immunocompetent and immunosuppressed *Spodoptera littoralis* larvae to baculovirus infection. *J Gen Virol.*87, 2217-25
- Roberts, D.W. and Humber, R.A. (1981) Entomopatogenous Fungi. En: *Biology of conidial fungi*. New York, Academic Press.
- Rodenburg, K. W. and Van der Horst, D. J. (2005) Lipoprotein-mediated lipid transport in insects: analogy to the mammalian lipid carrier system and novel concepts for the functioning of LDL receptor family members. *Biochim Biophys Acta.*1736, 10-29
- Rodrigo-Simon, A., de Maagd, R. A., Avilla, C., Bakker, P. L., Molthoff, J., Gonzalez-Zamora, J. E. and Ferre, J. (2006) Lack of detrimental effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins on the insect predator *Chrysoperla carnea*: a toxicological, histopathological, and biochemical analysis. *Appl Environ Microbiol.*72, 1595-603
- Rodriguez-Cabrera, L., Trujillo-Bacallao, D., Borrás-Hidalgo, O., Wright, D. J. and Ayra-Pardo, C. (2008) Molecular characterization of *Spodoptera frugiperda*-*Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin interaction. *Toxicon.*51, 681-92

- Rorhmann, G.F. (2008) An introduction to baculoviruses and their taxonomy, pp.9-16. En: Baculovirus Molecular Biology. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, Bethesda (USA).
- Rutschmann, S., Jung, A. C., Hetru, C., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A. and Ferrandon, D. (2000) The Rel protein DIF mediates the antifungal but not the antibacterial host defense in *Drosophila*. *Immunity*.12, 569-80
- Rutschmann, S., Jung, A. C., Zhou, R., Silverman, N., Hoffmann, J. A. and Ferrandon, D. (2000) Role of *Drosophila* IKK gamma in a toll-independent antibacterial immune response. *Nat Immunol*.1, 342-7
- Ryu, J. H., Ha, E. M. and Lee, W. J. (2010) Innate immunity and gut-microbe mutualism in *Drosophila*. *Dev Comp Immunol*.34, 369-76
- Sadd, B. M. and Schmid-Hempel, P. (2006) Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Curr Biol*.16, 1206-10
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*.4, 406-25
- Saldanha, A. J. (2004) Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics*.20, 3246-8
- Saleh, M. C., Tassetto, M., van Rij, R. P., Goic, B., Gausson, V., Berry, B., Jacquier, C., Antoniewski, C. and Andino, R. (2009) Antiviral immunity in *Drosophila* requires systemic RNA interference spread. *Nature*.458, 346-50
- Sampson, M. N. and Gooday, G. W. (1998) Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology*.144 (Pt 8), 2189-94
- Sayed, A. H., Crickmore, N. and Wright, D. J. (2001) Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* is toxic to the diamondback moth, *Plutella xylostella*, and synergizes the activity of Cry1Ac towards a resistant strain. *Appl Environ Microbiol*.67, 5859-61
- Scherfer, C., Karlsson, C., Loseva, O., Bidla, G., Goto, A., Havemann, J., Dushay, M. S. and Theopold, U. (2004) Isolation and characterization of hemolymph clotting factors in *Drosophila melanogaster* by a pullout method. *Curr Biol*.14, 625-9
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. and Dean, D. H. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*.62, 775-806
- Schweitzer, R. and Shilo, B. Z. (1997) A thousand and one roles for the *Drosophila* EGF receptor. *Trends Genet*.13, 191-6
- Sebesta, K. and Horska, K. (1970) Mechanism of inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Biochim Biophys Acta*.209, 357-76
- Shahidi Noghabi, S., Ansari, M. A. and Moens, M. (2006) Diversity in pathogenicity of *Steinernema carpocapsae* and its symbiotic bacterium for Spodoptera spp. *Commun Agric Appl Biol Sci*.71, 689-700

- Shai, Y. (2002) Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*.66, 236-48
- Shi, Y., Xu, W., Yuan, M., Tang, M., Chen, J. and Pang, Y. (2004) Expression of vip1/vip2 genes in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and the analysis of their signal peptides. *J Appl Microbiol*.97, 757-65
- Shin, S. W., Park, S. S., Park, D. S., Kim, M. G., Kim, S. C., Brey, P. T. and Park, H. Y. (1998) Isolation and characterization of immune-related genes from the fall webworm, *Hyphantria cunea*, using PCR-based differential display and subtractive cloning. *Insect Biochem Mol Biol*.28, 827-37
- Shrestha, S. and Kim, Y. (2007) An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits hemocyte phagocytosis of *Spodoptera exigua* by inhibiting phospholipase A(2). *J Invertebr Pathol*.96, 64-70
- Silverman, N., Zhou, R., Stoven, S., Pandey, N., Hultmark, D. and Maniatis, T. (2000) A *Drosophila* I κ B kinase complex required for Relish cleavage and antibacterial immunity. *Genes Dev*.14, 2461-71
- Smagghe, G., Auda, M., Van Laecke, K. and Degheele, D. (1997) Significance of penetration and metabolism on topical toxicity of diflubenzuron in *Spodoptera littoralis* and *Spodoptera exigua*. *Entomol. Exp. Appl.* 82:255-260
- Smits, P.H., Van Rie, M. and Vlask, J.M. (1987) Nuclear polyhedrosis virus for control of *Spodoptera exigua* larvae in glasshouse crops. *Entomol. Exp. Appl.* 43: 73-80.
- Smits, P.H. and Vlask, J.M. (1994) Registration of the first viral insecticide in the Netherlands: the development of Spod-X based on *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* 59/2A, 385-392
- Soberon, M., Pardo, L., Munoz-Garay, C., Sanchez, J., Gomez, I., Porta, H. and Bravo, A. (2010) Pore formation by Cry toxins. *Adv Exp Med Biol*.677, 127-42
- Stoltz, D. B., Pavan, C., and da Cunha, A. B. (1973) Nuclear polyhedrosis virus: A possible example of de novo intranuclear membrane morphogenesis. *J. Gen. Virol.* 19:145-150.
- Strizhov, N., Keller, M., Mathur, J., Koncz-Kalman, Z., Bosch, D., Prudovsky, E., Schell, J., Sneh, B., Koncz, C. and Zilberstein, A. (1996) A synthetic cryIC gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin, confers *Spodoptera* resistance in alfalfa and tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A*.93, 15012-7
- Stroschein-Stevenson, S. L., Foley, E., O'Farrell, P. H. and Johnson, A. D. (2006) Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans*. *PLoS Biol*.4, e4
- Stuart, L. M. and Ezekowitz, R. A. (2005) Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity*.22, 539-50
- Takatsuka, J. and Kunimi, Y. (2002) Lethal effects of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus isolated in Shiga Prefecture, Japan, on larvae of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Entomol. Zool.* 37: 93-101.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.*

Tanaka, H., Matsuki, H., Furukawa, S., Sagisaka, A., Kotani, E., Mori, H. and Yamakawa, M. (2007) Identification and functional analysis of Relish homologs in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim Biophys Acta.*1769, 559-68

Tanaka, H., Suzuki, N., Nakajima, Y., Sato, M., Sagisaka, A., Fujita, K., Ishibashi, J., Imanishi, S., Mita, K. and Yamakawa, M. (2010) Expression profiling of novel bacteria-induced genes from the silkworm, *Bombyx mori*. *Arch Insect Biochem Physiol.*73, 148-62

Tauszig-Delamasure, S., Bilak, H., Capovilla, M., Hoffmann, J. A. and Imler, J. L. (2002) *Drosophila* MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections. *Nat Immunol.*3, 91-7

Terenius, O. (2008) Hemolin-A lepidopteran anti-viral defense factor? *Dev Comp Immunol.*32, 311-6

Terra, W. R. (2001) The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch Insect Biochem Physiol.*47, 47-61

Thomas, W. E. and Ellar, D. J. (1983) *Bacillus thuringiensis var israelensis* crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. *J Cell Sci.*60, 181-97

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*25, 4876-82

Torres-Vila, L.M., Rodriguez-Molina, M.C., Lacasa, A., Palo, E., Mejias Tapia, M. and Guerrero, M. (1998) Susceptibilidad a 20 insecticidas de *Helicoverpa armigera* Hb. y *Spodoptera exigua* Hb. (Lepidoptera: Noctuidae) en las Vegas del Guadiana (Extremadura). *Bol. San. Veg. Plagas*, 24: 353-362,

Uttenweiler-Joseph, S., Moniatte, M., Lagueux, M., Van Dorsselaer, A., Hoffmann, J.A. and Bulet, P. (1998) Differential display of peptides induced during the immune response of *Drosophila*: a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Sep 15;95(19):11342-7.

Vadlamudi, R. K., Ji, T. H. and Bulla, L. A., Jr. (1993) A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis subsp. berliner*. *J Biol Chem.*268, 12334-40

Valaitis, A. P. (2008) *Bacillus thuringiensis* pore-forming toxins trigger massive shedding of GPI-anchored aminopeptidase N from gypsy moth midgut epithelial cells. *Insect Biochem Mol Biol.*38, 611-8

Valaitis, A. P., Jenkins, J. L., Lee, M. K., Dean, D. H. and Garner, K. J. (2001) Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. *Arch Insect Biochem Physiol.*46, 186-200

- Vallet-Gely, I., Opota, O., Boniface, A., Novikov, A. and Lemaitre, B. (2010) A secondary metabolite acting as a signalling molecule controls *Pseudomonas entomophila* virulence. *Cell Microbiol.*12, 1666-79
- van Munster, M., Prefontaine, G., Meunier, L., Elias, M., Mazza, A., Brousseau, R. and Masson, L. (2007) Altered gene expression in *Choristoneura fumiferana* and *Manduca sexta* in response to sublethal intoxication by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Insect Mol Biol.*16, 25-35
- van Oers, M. M. and Vlak, J. M. (2007) Baculovirus genomics. *Curr Drug Targets.*8, 1051-68
- Vidal, S., Khush, R. S., Leulier, F., Tzou, P., Nakamura, M. and Lemaitre, B. (2001) Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKs in the control of rel/NF-kappaB-dependent innate immune responses. *Genes Dev.*15, 1900-12
- Vilcinskis, A., Kopacek, P., Jegorov, A., Vey, and Matha, V. (1997) Detection of lipophorin as the major cyclosporin-binding protein in the haemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Com. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol. Toxicol.* 117, 41-45
- Vodovar, N., Vinals, M., Liehl, P., Basset, A., Degrouard, J., Spellman, P., Boccard, F. and Lemaitre, B. (2005) *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proc Natl Acad Sci U S A.*102, 11414-9
- Wang, P., Zhao, J. Z., Rodrigo-Simon, A., Kain, W., Janmaat, A. F., Shelton, A. M., Ferre, J. and Myers, J. (2007) Mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a greenhouse population of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Appl Environ Microbiol.*73, 1199-207
- Wang, Y., Willott, E. and Kanost, M. R. (1995) Organization and expression of the hemolin gene, a member of the immunoglobulin superfamily in an insect, *Manduca sexta*. *Insect Mol Biol.*4, 113-23
- Washburn, J. O., Haas-Stapleton, E. J., Tan, F. F., Beckage, N. E. and Volkman, L. E. (2000) Co-infection of *Manduca sexta* larvae with polydnavirus from *Cotesia congregata* increases susceptibility to fatal infection by *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus. *J Insect Physiol.*46, 179-190
- Washburn, J. O., Trudeau, D., Wong, J. F. and Volkman, L. E. (2003) Early pathogenesis of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus and *Helicoverpa zea* single nucleopolyhedrovirus in *Heliothis virescens*: a comparison of the 'M' and 'S' strategies for establishing fatal infection. *J Gen Virol.*84, 343-51
- Welchman, D. P., Aksoy, S., Jiggins, F. and Lemaitre, B. (2009) Insect immunity: from pattern recognition to symbiont-mediated host defense. *Cell Host Microbe.*6, 107-14
- Whalon, M. E. and Wingerd, B. A. (2003) Bt: mode of action and use. *Arch Insect Biochem Physiol.*54, 200-11
- Williamson, V. M. and Gleason, C. A. (2003) Plant-nematode interactions. *Curr Opin Plant Biol.*6, 327-33
- Young, J. A. and Dillin, A. (2004) MAPping innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*101, 12781-2

- Yu, X. Q., Gan, H. and Kanost, M. R. (1999) Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenol oxidase. *Insect Biochem Mol Biol.*29, 585-97
- Yu, X. Q. and Kanost, M. R. (2000) Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to gram-negative bacteria. *J Biol Chem.*275, 37373-81
- Yu, X. Q. and Kanost, M. R. (2004) Immulectin-2, a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte encapsulation and melanization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Comp Immunol.*28, 891-900
- Yuan, Z., Hansen, B. M., Andrup, L. and Eilenberg, J. (2002) Detection of enterotoxin genes in mosquito-larvicidal *Bacillus* species. *Curr Microbiol.*45, 221-5
- Yu, N.Y., Wagner, J.R., Laird, M.R., Melli, G., Rey, S., Lo, R. et al. (2010) PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 26: 1608– 1615.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 2002 Jan 24;415(6870):389-95.
- Zhang, B., Liu, M., Yang, Y. and Yuan, Z. (2006) Cytolytic toxin Cyt1Aa of *Bacillus thuringiensis* synergizes the mosquitocidal toxin Mtx1 of *Bacillus sphaericus*. *Biosci Biotechnol Biochem.*70, 2199-204
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Taussig, R. and Bulla, L. A., Jr. (2006) A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*103, 9897-902
- Zhang, X., Griko, N. B., Corona, S. K. and Bulla, L. A., Jr. (2008) Enhanced exocytosis of the receptor BT-R(1) induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* directly correlates to the execution of cell death. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*149, 581-8

ANEXOS

ANEXO 1: Dietas y medios de cultivo

1. Dieta artificial *S. exigua*

Agua	1 litro
Agar	18 g
Harina de maíz	96 g
Germen de trigo	64 g
Levadura	34 g
Caseína	10 g
Mezclado de sales Wesson ¹	5 g
Ácido ascórbico	9 g
Mezcla de vitaminas ²	0.06 g
Ácido sórbico (99%)	2.5 g
Tetraciclina	0.5 g
Nipagina	1 g
Aceite de maíz	4 ml

Mezclar el agar con el agua y el aceite de maíz y calentar a ebullición. Dejar enfriar hasta 55-60 °C y añadir el resto de los ingredientes mientras se mezcla vigorosamente con una batidora.

¹Mezcla de sales Wesson:

CaCO ₃	210 g
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0.39 g
FePO ₄	14.7 g
MnSO ₄ × H ₂ O	0.2 g
MgSO ₄ × 7H ₂ O	90 g
AlK(SO ₄) ₂ × 12H ₂ O	0.09 g
KCl	120 g
KH ₂ PO ₄	310 g
KI	0.05 g
NaCl	105 g
NaF	0.57 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	149 g

²Composición de la mezcla de vitaminas:

Ácido nicotínico	6 g
Riboflabina	3 g
Tiamina	1.5 g
Piridoxina	1.5 g
Pantotenato-Ca	12 g
Ácido fólico	3 g
Biotina	0.12 g
Cianocobalamina	0.012 g

2. Dieta artificial *D. melanogaster*

Levadura de pan prensada	100 g
Azúcar	70 g
Harina de trigo	50 g
Agar-agar	11.5 g
Ácido propiónico	5 ml
Agua destilada	Hasta 1 L

La levadura se resuspende en 300 ml de agua destilada y se mantiene al menos 30 minutos a 100°C. Posteriormente se añaden los restantes componentes a excepción del ácido propiónico y se enrasa hasta 1 litro con agua, se mezcla y se lleva a ebullición con agitación continuamente hasta alcanzar la textura adecuada. Se deja reposar hasta que la temperatura baja a 60 °C y se añade el ácido propiónico. A continuación se vierte la dieta en los viales y se deja enfriar.

3. Composición medio de cultivo bacteriano LB

Para 1 litro de medio:	
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua	1l

Autoclavar para esterilizar durante 20 minutos con el programa de líquidos.

Para hacer placas añadir 15 g de agar a la mezcla anterior.

4. Composición medio de cultivo de levaduras: SD glucosa

Se han utilizado dos medios SD preparados de forma diferente:

Utilizado en **Wageningen** (2l.):

Base nitrogenada de levaduras sin aminoácidos	13.4 g
Dextrosa (D-glucosa)	40.0 g
Añadir hasta 1800 ml con agua destilada.	

Autoclavar 20 minutos a presión de 1 atmósfera.

Para hacer placas añadimos 20 g/l a la mezcla anterior.

Antes de usar: añadir 10X solución Dropout con los aminoácidos apropiados

10x Solución Dropout

Para preparar el completo, añadir todos los aminoácidos. Para preparar el medio de selección no se debe añadir el componente adecuado:

L-Isoleucine	300 mg/L
L-Valine	1500 mg/L
L-Adenine hemisulfate salt	200 mg/L
L-Arginine HCl	200 mg/L
L-Histidine HCl Monohydrate	200 mg/L
L-Leucine	1000 mg/L
L-Lysine HCl	300 mg/L
L-Methionine	200 mg/L
L-Phenylalanine	500 mg/L
L-Threonine	2000 mg/L
L-Tryptophan	200 mg/L
L-Tyrosine	300 mg/L
L-Uracil	200 mg/L

Utilizado en **Valencia** (2l.):

Base nitrogenada de levaduras sin aminoácidos	13 g
Dextrosa (D-glucosa)	40 g
Agua destilada	2 l
DO supplement –A/-His/-Leu/-Trp (Clontech)	1,3 g

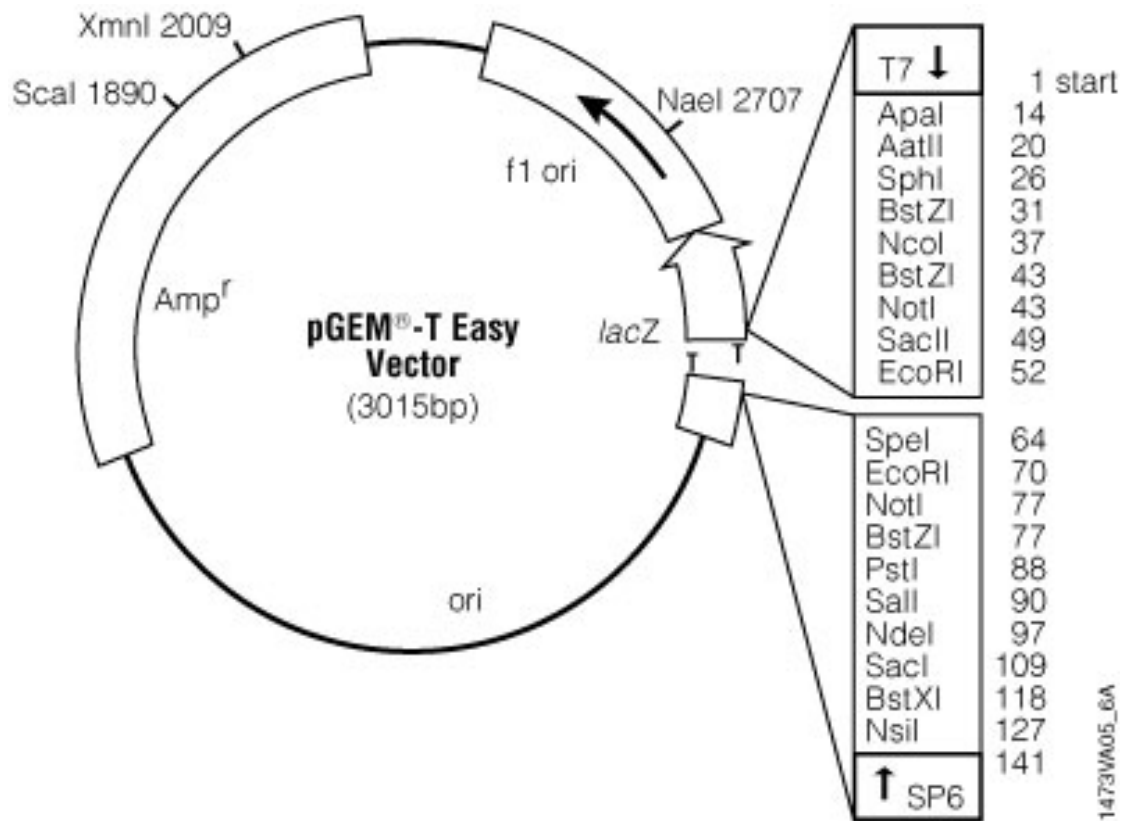
Ajustar pH a 5'6 con 10N NaOH y autoclavar a 121 °C 20 minutos.

Para preparar placas añadir agar 15 g/l a la mezcla anterior.

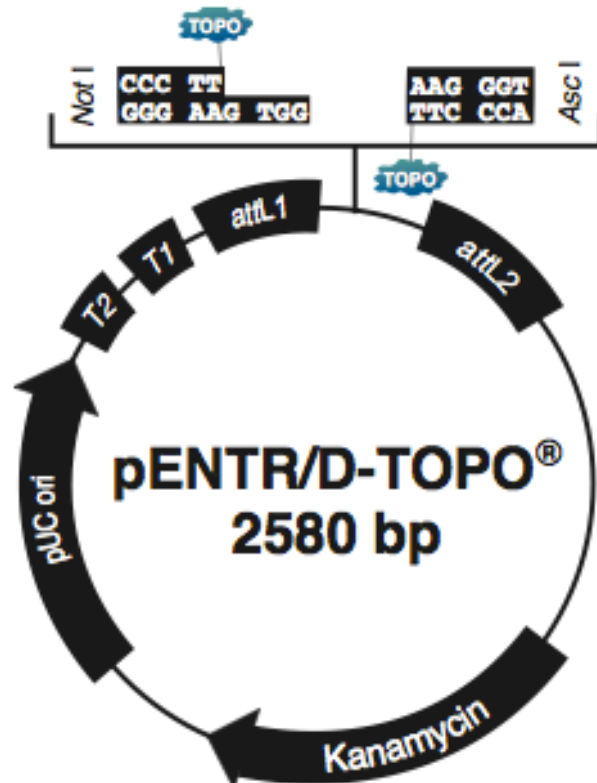
Según el medio de selección se le añaden los diferentes aminoácidos que le faltan al DO supplement excepto aquel/aquellos que se utilizarán para la selección en las mismas concentraciones que se usaron en la tabla anterior (en el medio utilizado en Wageningen). Una vez preparada, la solución es filtrada y se mantiene a 4 °C.

ANEXO 2: Vectores

pGEM-T Easy Vector (Promega)



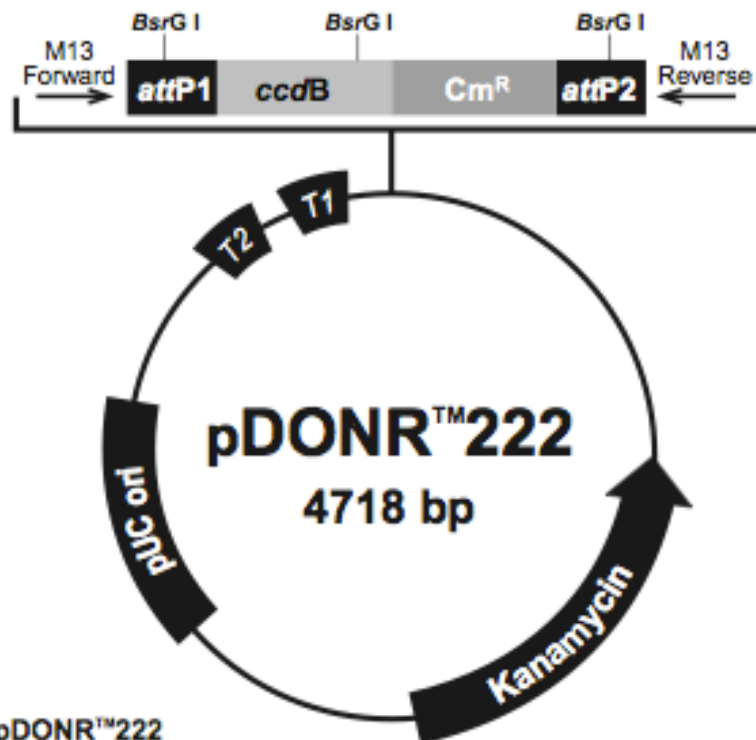
pENTR/D-TOPO (Invitrogen)



Comments for pENTR/D-TOPO[®]
 2580 nucleotides

rrnB T2 transcription termination sequence: bases 268-295
rrnB T1 transcription termination sequence: bases 427-470
 M13 forward (-20) priming site: bases 537-552
 attL1: bases 569-668 (complementary strand)
 TOPO[®] recognition site 1: bases 680-684
 Overhang: bases 685-688
 TOPO[®] recognition site 2: bases 689-693
 attL2: bases 705-804
 M13 reverse priming site: bases 845-861
 Kanamycin resistance gene: bases 974-1783
 pUC origin: bases 1904-2577

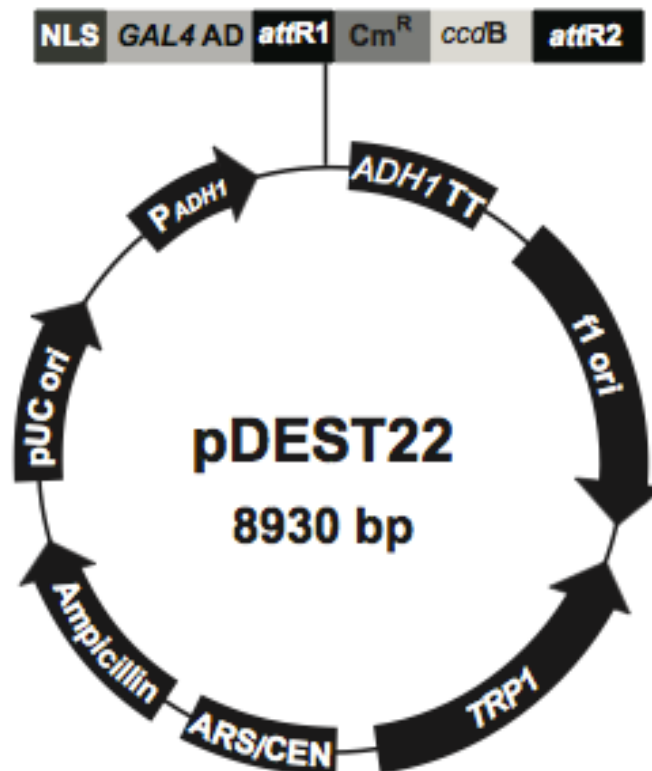
pDONR222 (Invitrogen)



Comments for pDONR[™]222
4718 nucleotides

- rrnB* T2 transcription termination sequence: bases 58-85 (c)
 - rrnB* T1 transcription termination sequence: bases 217-260 (c)
 - M13 Forward (-20) priming site: bases 327-342
 - attP1*: bases 360-591
 - BsrGI* restriction sites: bases 442, 1232, 2689
 - ccdB* gene: bases 987-1292 (c)
 - Chloramphenicol resistance gene: bases 1612-2295 (c)
 - attP2*: bases 2543-2774 (c)
 - M13 Reverse priming site: bases 2816-2832
 - Kanamycin resistance gene: bases 2899-3714 (c)
 - pUC origin: bases 4045-4718
- (c) = complementary strand

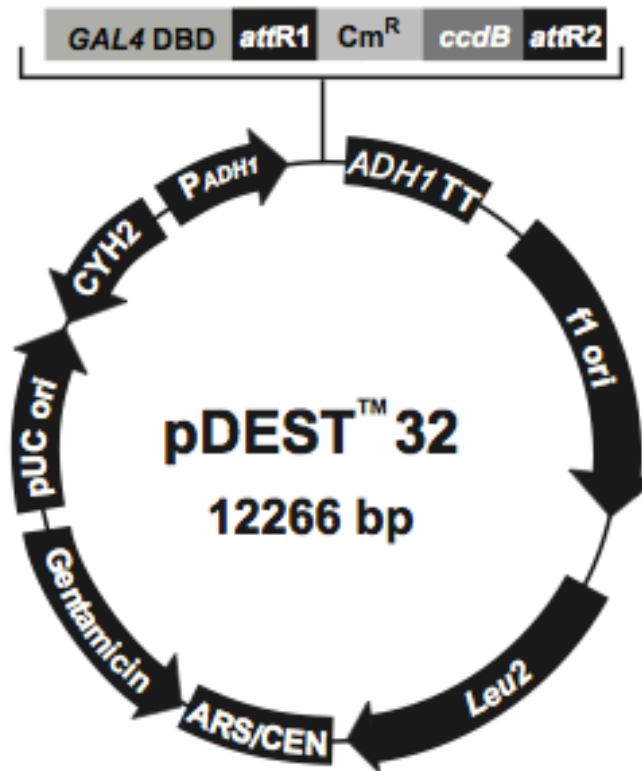
pDEST22 (Invitrogen)



Comments for pDEST22
8930 nucleotides

ADH1 promoter: bases 272-1726
 Nuclear localization signal (NLS): bases 1734-1754
 GAL4 DNA activation domain: bases 1761-2105
attR1 site: bases 2121-2245
 Chloramphenicol resistance (Cm^R) gene: bases 2495-3154
ccdB gene: bases 3495-3800
attR2 site: bases 3841-3965
ADH1 transcription termination region: bases 4203-4360
f1 origin: bases 4687-5142
TRP1 gene: bases 5245-5919 (c)
 ARS4/CEN6 origin: bases 6455-6972
 Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 7104-7964
 pUC origin: bases 8109-8782

pDEST32 (Invitrogen)



Comments for pDESTTM 32
12266 nucleotides

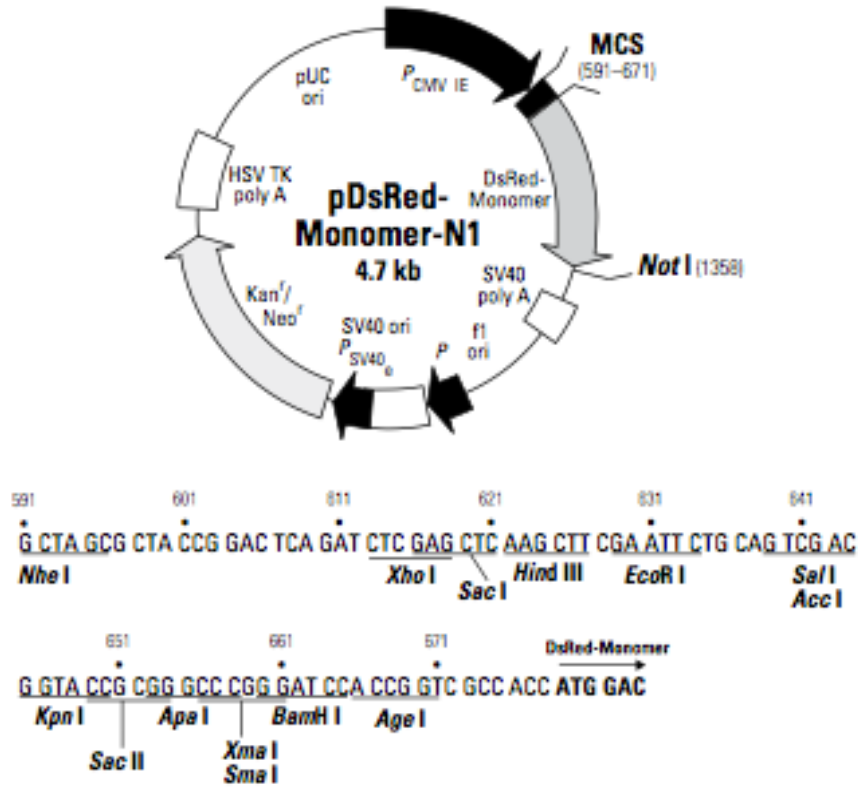
- ADH1 promoter: bases 103-1557
 - GAL4 DNA binding domain: bases 1581-2024
 - attR1 site: bases 2037-2161
 - Chloramphenicol resistance (Cm^R) gene: bases 2411-3070
 - ccdB gene: bases 3411-3716
 - attR2 site: bases 3757-3881
 - ADH1 transcription termination region: bases 4119-4276
 - f1 origin: bases 4603-5058
 - Leu2 gene: bases 5767-6861
 - ARS4/CEN6 origin: bases 7589-8107
 - Gentamicin resistance gene: bases 8452-8985 (c)
 - pUC origin: bases 9833-10506
 - Cycloheximide sensitivity (CYH2): bases 11445-11894 (c)
- (c) = complementary strand

pDsRed-Monomer-N1 (Clontech)

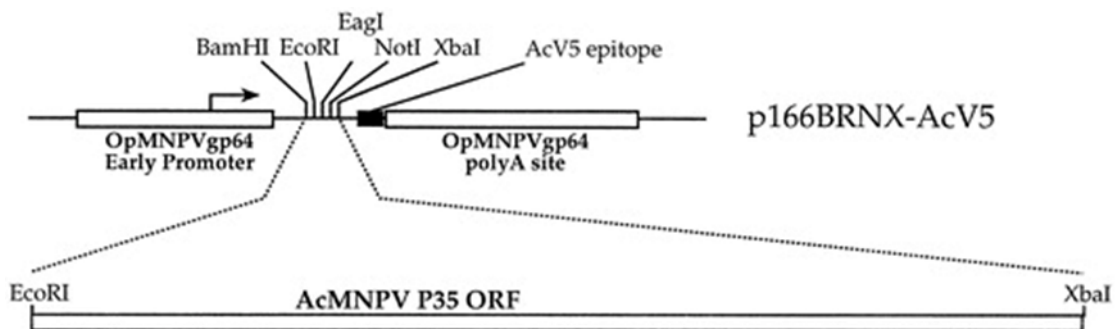
pDsRed-Monomer-N1 Vector Information

PT379

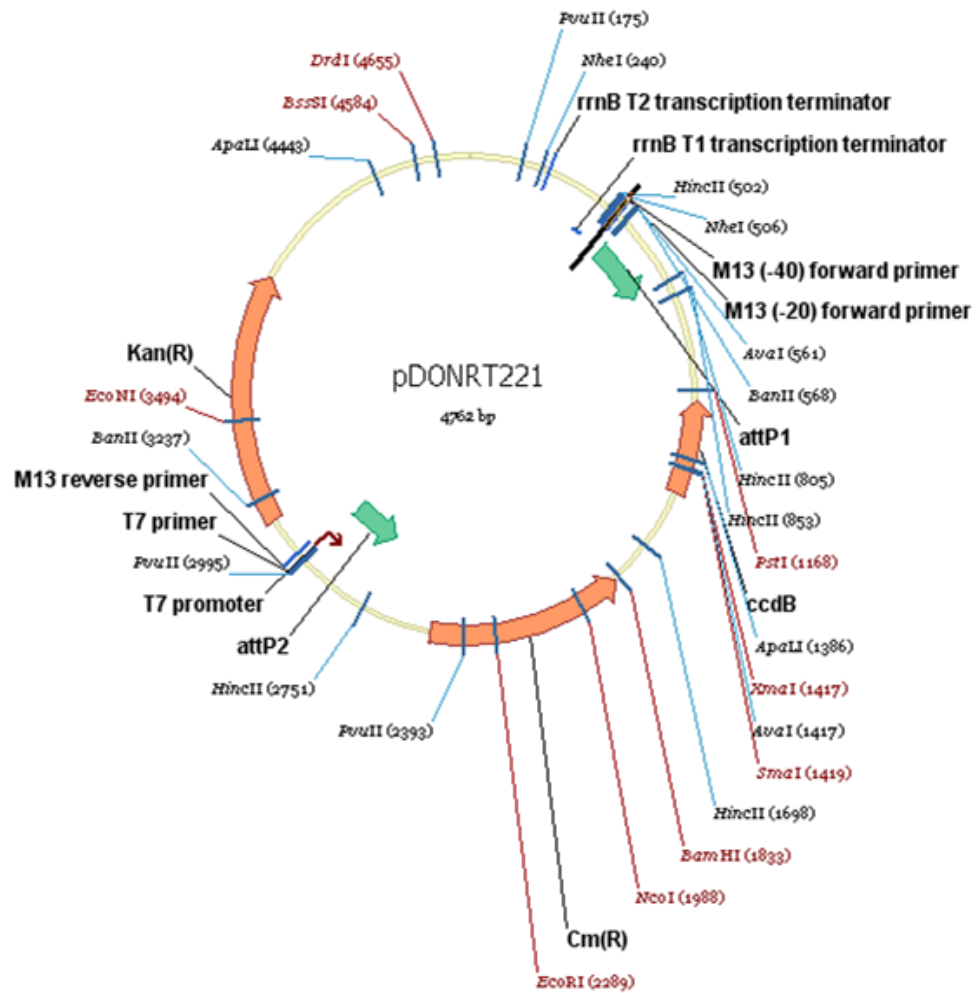
Cat. No. 632



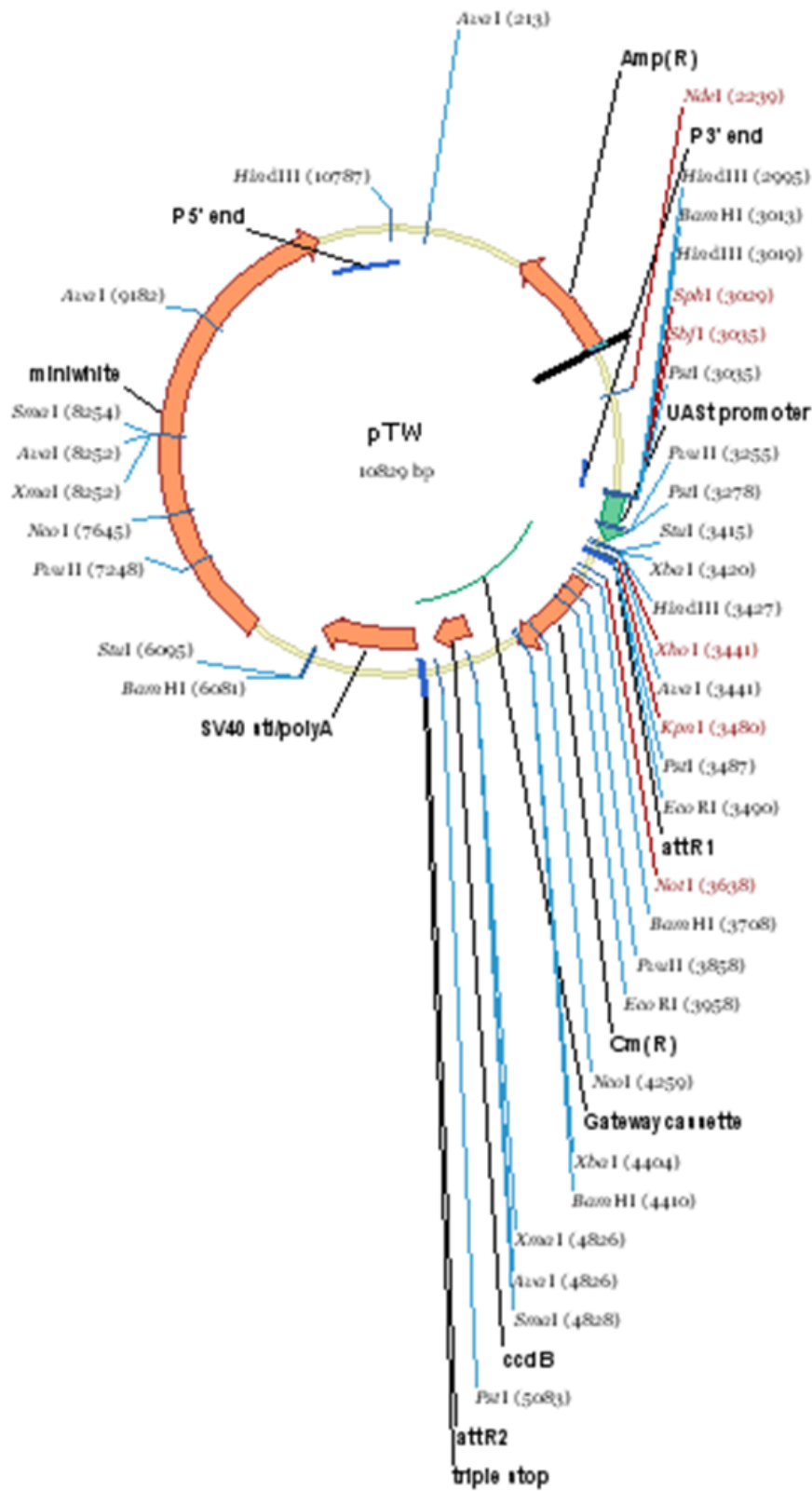
p166BRNX-AcV5



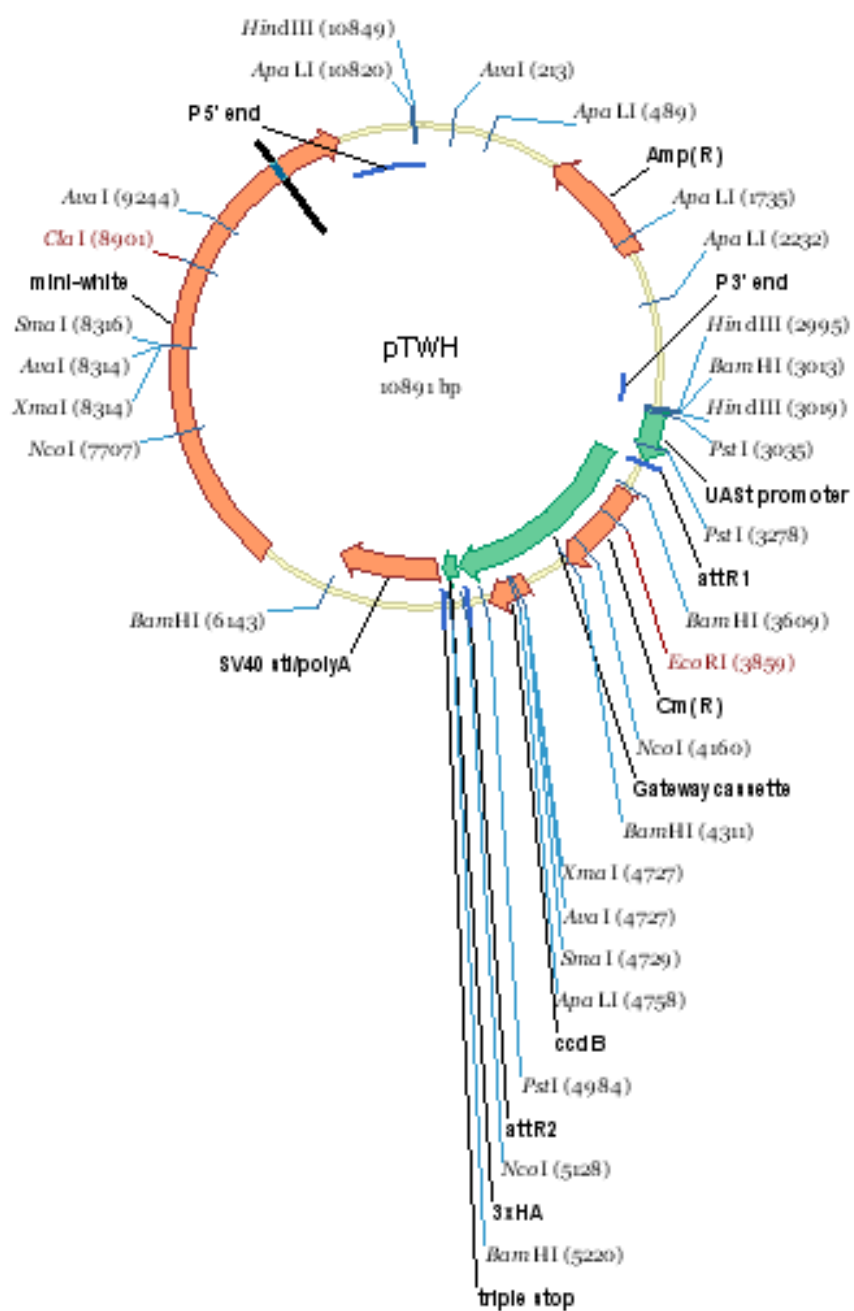
pDONRT221 (Invitrogen)



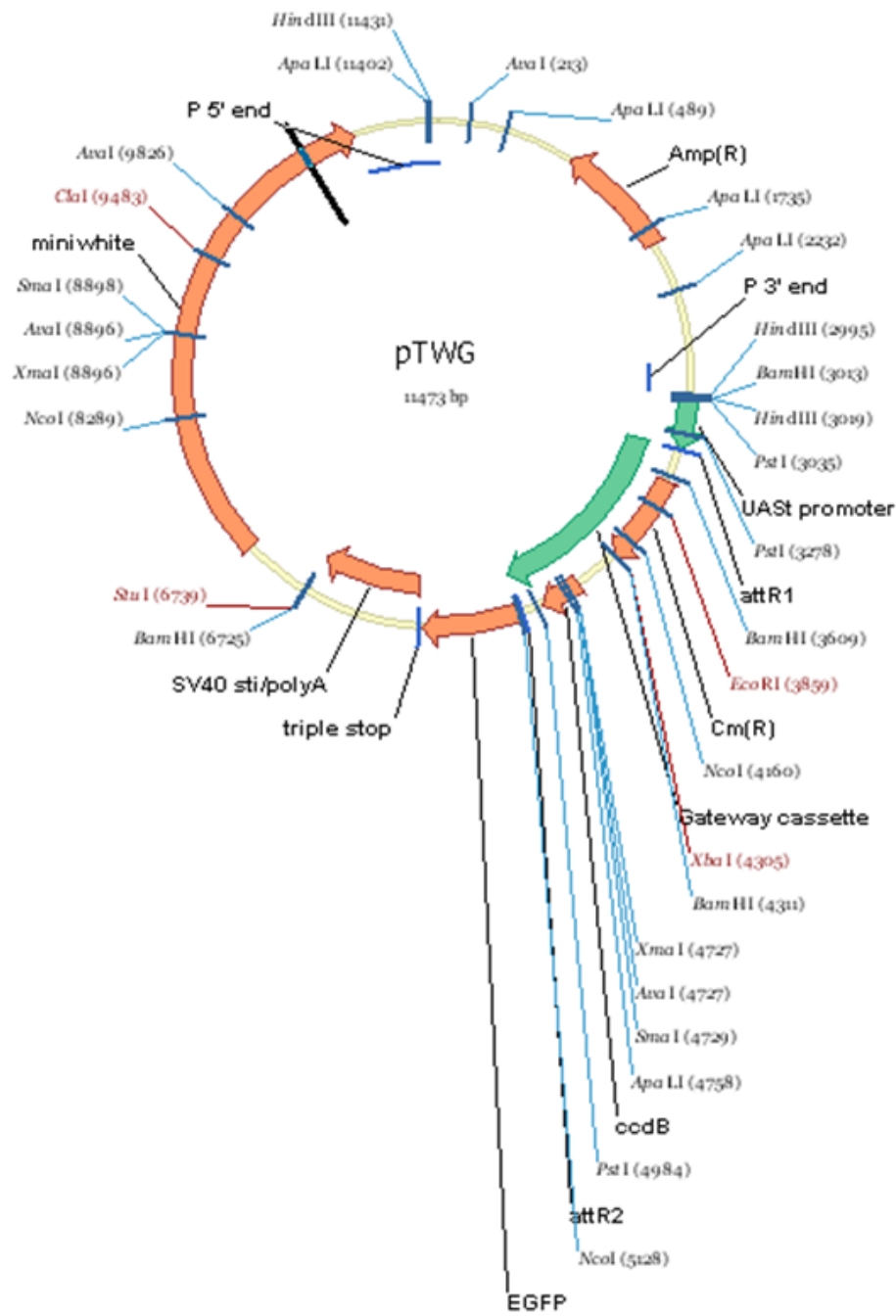
pTW



pTWH



pTWG



Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.

Marie Curie