

CAPÍTULO 8

α -HEMOLISINA DE *ESCHERICHIA COLI*:
PROTOTIPO DE LAS TOXINAS RTX (*REPEAT IN TOXIN*)
UN ESTUDIO DE LAS ETAPAS DE SU MECANISMO DE ACCIÓN

Romina Vazquez¹, Sabina Maté¹, Vanesa Herlax¹ y Laura Bakás^{1,2*}

¹Instituto de Investigaciones Bioquímicas,(INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas,²Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata(UNLP)

*Autor para correspondencia. Dirección de correo electrónico:
lbakas@biol.unlp.edu.ar

RESUMEN

Escherichia coli es una de las bacterias anaerobias facultativas más predominantes en el intestino, siendo en la mayoría de los casos, inocua para el huésped. Sin embargo, existen cepas que alcanzan al torrente sanguíneo lo que ocasiona enfermedades extraintestinales como infecciones urinarias, septicemia y meningitis. Dentro de éstas se encuentran las cepas uropatogénicas (*Uropathogenic Escherichia coli*: UPEC), que secretan varios factores de virulencia que incluyen: toxinas, sistemas de adquisición de hierro, adhesinas y antígenos capsulares. Las principales toxinas secretadas son: *alfa*-hemolisina (HlyA) y el factor necrotizante citotóxico 1 (CNF-1). En esta revisión se presenta una descripción del estudio de las diferentes etapas de su mecanismo de acción poniendo énfasis en la presentación de resultados obtenidos mediante el uso de novedosas metodologías, como la Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR), la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), la Transferencia de Energía Resonante de Fluorescencia (FRET) y las Bicapas Lipídicas Planas (BLM).

Palabras clave: Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR), FRET, Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), Poros Proteolipídicos

ABSTRACT

Escherichia coli is one of the predominant species of facultative anaerobes in the human gut, and in the majority of the cases it is harmless to the host. Some strains of these species can translocate to blood and cause infection such as urinary infection, septicemia and meningitis. These are the uropathogenic *Escherichia coli* strains (UPEC) that secrete several virulence factors. The latter include a number of secreted toxins, iron-acquisition systems, adhesins, and capsular antigens. Secreted toxins include HlyA and the cytotoxic necrotizing factor-1 (CNF-1).

This review presents a description of the study of the different stages of HlyA's mechanism of action, focusing on the presentation of results obtained through the use of innovative methods such as surface plasmon resonance (SPR), atomic force microscopy (AFM), Fluorescence Resonant Energy Transfer (FRET) and planar lipid bilayers (BLM).

Key words: Surface Plasmon Resonance (SPR), Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), Atomic Force Microscopy (AFM), Proteolipidic pores.

1. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es la bacteria responsable de, al menos, el 80% de las infecciones del tracto urinario (ITU), patología que actualmente se encuentra entre las infecciones más comunes en el mundo (Marrs et al., 2005). Las cepas de *E. coli* que causan ITU son llamadas cepas uropatógenicas (Uropathogenic *Escherichia coli*: UPEC). En los últimos años se ha obtenido una enorme cantidad de información proveniente de la secuenciación de genomas de varias cepas clínicas. Estos datos, junto con informes epidemiológicos, han confirmado que diferentes cepas de *E. coli* comparten muchos factores de virulencia que incluyen toxinas secretadas, sistemas de adquisición de hierro, adhesinas y antígenos capsulares. Las proteínas secretadas, entre las que se incluyen la toxina proteica *alfa*-hemolisina (HlyA) y el factor necrotizante citotóxico 1 (CNF-1), pueden modificar las cascadas de señalización de las células huésped, y alterar la respuesta inflamatoria e inducir la muerte celular, mientras que los sideróforos como aerobactina,

bacteriocina y enterobactina permiten que las bacterias secuestren hierro (Wiles et al., 2008). Experimentos realizados en cultivo celular han mostrado que altos niveles de HlyA pueden causar la lisis osmótica de la célula huésped, mientras que concentraciones sublétricas de la toxina pueden modular las rutas de supervivencia de la célula huésped (Wiles et al., 2008), (Dhakal y Mulvey, 2012). Tanto HlyA como CNF-1 pueden, además, estimular la ruptura de la barrera epitelial (Smith et al., 2008) y son los responsables de la translocación de la bacteria desde el tracto digestivo al torrente sanguíneo para finalmente diseminarse y colonizar diferentes tejidos, como el nervioso y el urinario, causando así la patología.

HlyA representa el prototipo de una familia de proteínas denominada RTX (*Repeat in Toxin*) caracterizada por Welch (1991). Estas proteínas son producidas por una gran variedad de bacterias gram-negativas y exhiben dos características comunes: la presencia de la repetición de un nonapéptido rico en residuos de glicina y ácido aspártico, localizados cerca de la porción C-terminal y la secreción a través del sistema tipo I (un transportador ABC *cassette*). El grupo de proteínas RTX comprende toxinas, la mayoría de ellas con actividad formadora de poros que se detecta por la formación de un halo hemolítico rodeando a las colonias cuando éstas crecen en placas agar sangre. La síntesis, maduración y secreción de HlyA está determinada por el operón *hlyCABD*. El gen estructural *hlyA* codifica para un polipéptido de 110-kDa. Este polipéptido, denominado proHlyA, es la forma inactiva de la toxina. ProHlyA se convierte en la forma lítica luego de una activación postraduccional en el citosol de la bacteria antes de su exportación al medio extracelular. La modificación postraduccional consiste en la acilación de dos residuos internos de Lys mediante enlaces ϵ -amino, catalizados por la aciltransferasa HlyC. La importancia de esta modificación postraduccional radica en que cambia el comportamiento de la proteína de una forma benigna a una forma netamente tóxica. En la **Fig. 1** se muestran los dominios de la proteína más relevantes para el mecanismo de acción.

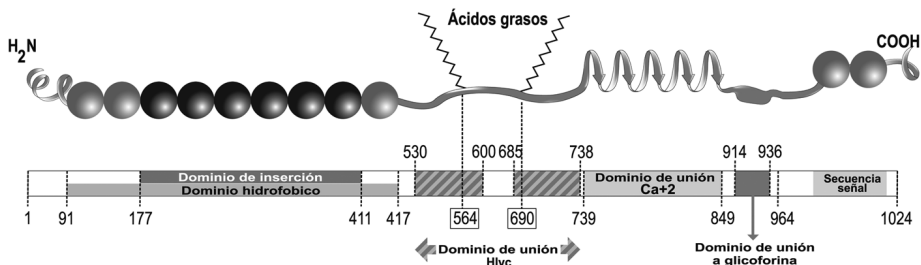


Figura 1. Esquema de la estructura de HlyA donde se indican los dominios más relevantes para el mecanismo de acción. (Figura adaptada del capítulo “E. coli alpha hemolysin and properties” del libro *Biochemistry Book I*, Ekinci, D. (Ed), Intech, Croacia. (2012))

HlyA actúa sobre una gran variedad de tipos celulares de diversas especies –ej.: glóbulos rojos, fibroblastos embrionarios y adultos, granulocitos, linfocitos y macrófagos (Cavalieri et al., 1984), – actuando también sobre sistemas modelo de membranas (liposomas) (Ostolaza et al., 1993).

El microambiente encontrado por las bacterias en el huésped es extremadamente pobre en nutrientes de allí que una de las funciones de HlyA sea la destrucción de las células blanco, facilitando de esta manera su aporte de nutrientes y otros factores críticos para su crecimiento tales como el hierro. El mecanismo de acción lítica es un mecanismo complejo que finaliza en la lisis celular. En este proceso, se han reconocido al menos 3 etapas: unión a la membrana de la célula blanco, inserción y oligomerización.

A continuación, presentamos las metodologías empleadas en el estudio de cada una de estas etapas, así como los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo sobre el mecanismo de acción de HlyA.

2. METODOLOGÍAS PARA EL ESTUDIO DE LAS DIFERENTES ETAPAS DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE HLYA

2.1. Estudio de la unión a membranas por SPR:

En este apartado se revisará brevemente el uso de la técnica de SPR para el estudio del primer paso del mecanismo de acción de las proteínas formadoras de poro (PFT), esto es, la unión de la toxina a la membrana y/o a receptores de membrana.

La Resonancia de plasmones superficiales se ha convertido en una técnica muy valiosa para el análisis de las interacciones entre moléculas. Inicialmente esta técnica se utilizó para el estudio de las interacciones proteína-proteína, proteína-ligando o proteína-ácido nucleico. (Myszka, 1997), (Lakey y Raggett, 1998). En los últimos años su uso se ha expandido al estudio de la interacción proteína-membrana (Anderluh et al., 2003).

La técnica SPR es muy ventajosa para este tipo de estudios ya que permite la determinación de forma rápida y directa de las velocidades de asociación y disociación y el monitoreo de la unión de las proteínas a una

membrana sin necesidad del marcaje de la proteína o los lípidos con sondas específicas. Esta técnica posee una alta sensibilidad de detección, lo que posibilita trabajar con bajas concentraciones de muestra (en el rango nM). Los experimentos de SPR no sólo permiten obtener información relativa a la afinidad entre biomoléculas (cálculo de las constantes de unión), sino que también proveen información cinética, que puede ayudar a comprender el modo de unión, la existencia de cambios conformacionales y de eventos de oligomerización (de Mol and Fischer 2010).

En un experimento típico de SPR, se forma una membrana de lípidos (ligando) encima de una superficie de oro recubierta con una monocapa hidrofílica denominada “chip-sensor”, sobre la que luego se hace pasar un flujo de una solución de proteína (analito) a una determinada concentración. La unión de la proteína a la membrana cambia el índice de refracción cerca de la superficie, lo que resulta en el cambio del ángulo de resonancia al cual se sintonizan los plasmones de superficie, que son excitados con un laser de 670 nm en condición de reflexión total interna (TIR). El cambio se expresa en unidades de corrimiento del ángulo de resonancia y es linealmente proporcional a la cantidad de proteína unida. Las curvas de unión (sensogramas) se utilizan para determinar las velocidades de asociación y disociación ajustando los datos experimentales a un modelo de unión.

Existen diferentes métodos experimentales para la preparación de la superficie del sensor de SPR mimetizando membranas lipídicas. Estos métodos contemplan tanto la preparación de membranas lipídicas planas como de liposomas intactos “capturados” sobre el sensor. Una revisión muy gráfica e informativa de dichos métodos ha sido presentada por Besenicar y col (Besenicar y Anderluh, 2010). Algunas de estas modalidades y/o variantes de las mismas han sido utilizadas en los últimos años para el estudio de la interacción de PFT y membranas (Anderluh et al., 2003), (Anderluh et al., 2005), (Maula et al., 2013), (Brown et al., 2013). Recientemente, mediante experimentos de SPR, nuestro grupo de trabajo estudió la interacción de la toxina HlyA con liposomas de diferente composición lipídica, demostrando que la presencia de colesterol en la membrana facilita la unión de la toxina a la misma (Vazquez et al., 2014). Dichos experimentos se llevaron a cabo siguiendo un modelo experimental novedoso. La toxina fue dializada frente a acetato de sodio (pH4) para luego proceder a su inmovilización [450 RU (unidades de resonancia)] sobre la superficie del chip CM5 activado previamente con EDC [N-etil-N-(3 - dimetilaminopropil)

carbodiimida/NHS (N-hidroxisuccinimida), según Fernandez y col (2006). Los analitos (liposomas de diferente composición), así como el receptor proteico de la toxina (glicoforina), se aplicaron en diferentes concentraciones sobre la toxina inmovilizada. El análisis de los datos se realizó utilizando el software BIAevaluation™ para ajustar los datos a un modelo de unión 1/1 y determinar la constante de disociación (KD) del sistema en el equilibrio (**Fig. 2**).

Aquellos lectores interesados en profundizar la lectura sobre la técnica de SPR, sus aplicaciones y aspectos metodológicos, pueden obtener más información en el libro de Mol and Fischer (2010).

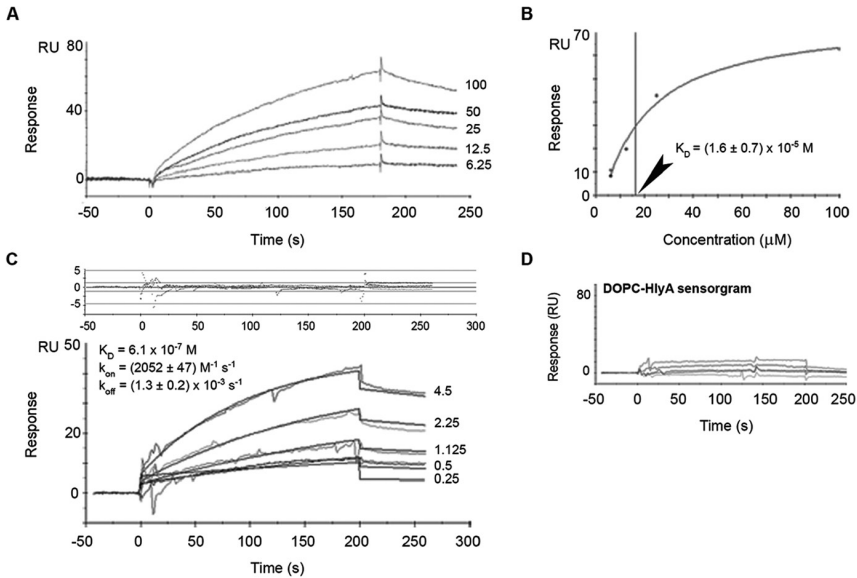


Figura 2. Interacción de HlyA con liposomas de diferentes composiciones lipídicas. La toxina HlyA se inmovilizó (450 RU) sobre el sensor-chip y se hizo pasar un flujo determinado de una suspensión de liposomas de dioleoilfosfatidilcolina (DOPC):Colesterol (Col);(4:1) (A y B), una solución de glicoforina (C) o una suspensión de liposomas de DOPC (D), en las concentraciones indicadas para cada curva (μM). Las curvas muestran que existe unión específica (A y C) o inespecífica (D), luego de sustraer los valores obtenidos cuando se hizo pasar el flujo sobre una superficie control, sin proteína inmovilizada (B) La determinación de la KD de la interacción HlyA-liposomas de DOPC:Col se realizó mediante un análisis no lineal (C) Los sensogramas se ajustaron a un modelo de unión 1:1 y se determinaron los parámetros Kon y Koff. Datos publicados en trabajo de Vazquez et al. (Vazquez et al., 2014).

2.2. Inserción de la Toxina en la Membrana. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La microscopía de fuerza atómica (AFM), pertenece a una gran familia de técnicas de microscopías por barrido de sondas (SPM), que permite generar una imagen topográfica (3D) con resolución atómica de la superficie de la muestra.

La AFM se basa en la detección mecánica de fuerzas débiles entre una punta muy delgada, montada sobre un soporte flexible (*cantilever*) posicionado mediante un elemento piezo eléctrico y la superficie de la muestra. De esta forma se pueden medir las fuerzas superficiales en un rango de 10^{-13} a 10^{-6} N. El microscopio de fuerza atómica mide las deflexiones en el *cantilever* debido a las fuerzas capilares, electrostáticas, de Van der Waals y friccionales entre la punta y la superficie (Daza Millone 2011). Las tres piezas básicas que componen este tipo de microscopio son los transductores piezo eléctricos (*scanners*), los transductores de fuerza y el control de retroalimentación. Básicamente, el *scanner* mueve la punta respecto de la superficie o viceversa mientras que el transductor de fuerza censa el cambio de fuerza entre la punta y la muestra y el control de retroalimentación reenvía la señal al piezoeléctrico para mantener la fuerza fija entre la punta y la muestra. Casi todos los microscopios de fuerza atómica utilizan un sistema de deflexión de rayo láser, donde el láser es reflejado desde el *cantilever* reflectivo hacia un fotodetector sensible a la posición. El camino óptico entre el *cantilever* y el fotodetector produce una amplificación mecánica de la señal del láser y como consecuencia, el sistema llega a detectar los movimientos verticales de la punta con una precisión inferior a un Ångstrom (Daza Millone, 2011). La AFM permite el estudio de estructuras de origen biológico en un entorno semejante al que se encuentran naturalmente (medio acuoso), en lugar de sufrir un proceso de metalización como se procede en las microscopías electrónicas. En este sentido, en los últimos años la técnica de AFM ha representado una herramienta muy productiva para el estudio de la interacción de numerosas toxinas con membranas, como informan, por ejemplo, Alessandrini y col, (Alessandrini et al., 2013), Shaw y col (Shaw et al., 2008), Won y col (Won et al., 2012) and Ros y col (Ros et al., 2013).

En un trabajo reciente hemos estudiado la influencia de la composición y propiedades de las membranas (segregación de fases) en la inserción de la toxina HlyA. Para ello se realizaron experimentos en sistemas de

membranas modelo, empleando la técnica de monocapas y AFM. En dicho trabajo se visualizó por primera vez, mediante AFM en tiempo real, la interacción de HlyA con bicapas de DOPC:palmitoil-esfingomiolina (16:oSM):-Col en relación molar (2:1:1) soportadas sobre mica. Se determinó que la inserción inicial de la toxina HlyA se produce a nivel de los límites entre los dominios de la membrana que se encuentran en fase liquido-ordenada (dominios *lo*, ricos en 16:oSM y colesterol) y las fases liquido-desordenadas (fases *ld*, enriquecidas en DOPC). Sin embargo, a medida que pasa el tiempo, la inserción de la toxina se produce preferencialmente a nivel de las fases liquido-desordenadas, caracterizadas por un menor empaquetamiento lipídico (Mate et al., 2014). Las imágenes de AFM también evidencian que la interacción de HlyA con las zonas de defecto de la membrana no se ajusta al tipo de comportamiento descrito como estrategia general para otras proteínas membranolíticas. Los autores consideran que dicho resultado constituye un ejemplo más que demuestra el mecanismo de acción “paradójico” de esta toxina, como mostraremos en la última sección en relación a la estabilización por lípidos del poro preteolipídico formado por la HlyA.

En la **Fig. 3** se resumen los resultados mencionados relacionados con la interacción de HlyA con membranas que presentan segregación lateral de fases.

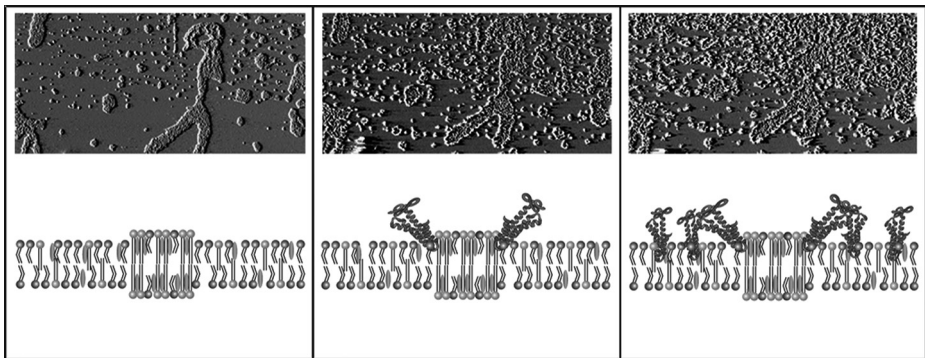


Figura 3. Interacción de HlyA con membranas que presentan segregación lateral de fases. Las imágenes en escala de grises (parte superior de la Figura) corresponden a la visualización mediante AFM, en tiempo real, de dicha interacción. En los paneles inferiores de la figura se representa de manera esquemática una membrana que presenta dominios *lo* (mas altos), rodeados por fases *ld*, de menor espesor. La inserción de HlyA se produce inicialmente a nivel de límites (boundaries) entre fases, permitiendo interacciones lípido-proteína

que estabilizarían los bordes de los dominios lo. La inserción posterior de más moléculas de HlyA se produciría a nivel de las fases ld. Esta figura corresponde al graphical abstract del trabajo publicado por Maté y col(Mate et al., 2014), con el permiso de Elsevier.

2.3. Estudio del proceso de oligomerización por FRET

Como mencionamos anteriormente, el mecanismo de acción lítico es un mecanismo complejo que finaliza en la lisis celular. En este proceso se han reconocido al menos 3 etapas: unión a la membrana de la célula blanco, inserción y oligomerización. En esta sección describiremos el estudio de la oligomerización mediante la técnica de FRET.

En el proceso de FRET, la energía de una molécula excitada o donador (D) es cedida a otra que actúa como aceptor (A). Esta transferencia ocurre sin emisión de fotones y es el resultado de la interacción dipolo-dipolo entre D y A. El grado de FRET depende de la extensión de solapamiento entre el espectro de emisión del D y el espectro de absorción del A, la orientación relativa de los dipolos de transición del D y A y la distancia entre estas dos moléculas. Esta última dependencia es la que determina la utilidad de la transferencia de energía para determinar distancias entre D y A. Tales mediciones requieren que el par D-A esté separado una distancia que no varíe durante la vida media del estado excitado del D.

La velocidad de FRET (k_f) desde un donador específico a un aceptor está dada por: $k_f = 1/\tau (R_0/r)^6$, donde τ es el tiempo de vida del donador en ausencia de A, r es la distancia entre D y A, y R_0 es una distancia característica de cada par D-A, llamada distancia de Förster, a la cual la eficiencia de FRET es del 50% (Forster, 1959). Esta dependencia con la distancia depende de las características espectrales de los fluoróforos empleados, pero por lo general las distancias son de alrededor de 10–100 nm, por lo que experimentos de FRET pueden ser utilizados para estudios estructurales de proteínas (Lakowicz et al., 1990), cambios conformacionales (Heyduk, 2002) e interacciones entre moléculas (Parsons et al., 2004). Específicamente nuestro grupo de trabajo ha utilizado esta técnica para el estudio del proceso de oligomerización de HlyA en membranas de fantasmas de eritrocitos (Herlax et al., 2009).

Cuando D y A son químicamente diferentes, la eficiencia del proceso se puede medir como: (a) aumento de la intensidad de fluorescencia del aceptor; (b) disminución de la intensidad de fluorescencia del donador; o (c)

disminución del tiempo de vida media de fluorescencia del donador. Para los experimentos realizados con HlyA se eligieron Alexa-488 (D) y Alexa-546 (A). La determinación de la eficiencia de transferencia de energía se realizó mediante el método (a).

HlyA no contiene residuos de Cys en su secuencia, por lo que para los ensayos se utilizaron mutantes puntuales de HlyA donde se cambió una Lys por Cys (HlyA K344C). El mismo mutante puntual se utilizó para la proteína no acilada, la forma inactiva de HlyA (proHlyA K344C). La presencia de Cys en las proteínas mutantes permite la introducción de sondas derivadas de maleimida que se unen específicamente a residuos de Cys en una relación sonda:proteína de 1:1. Para realizar los experimentos se marcaron dos poblaciones de cada una de las proteínas con Alexa-488 y otra con Alexa-546 y se las enfrentó a fantasmas de eritrocitos (Herlax et al., 2009). Experimentos de FRET pueden realizarse para estudiar la distribución de moléculas en membranas porque el espacio promedio entre las moléculas de interés dependerá principalmente de su ordenamiento lateral. Por lo tanto, las moléculas podrán estar dentro del rango de distancia para que haya FRET ya sea porque se encuentran agrupadas formando oligómeros o porque se distribuyan al azar en la superficie debido a su alta densidad, forzando a una fracción de moléculas a estar dentro de las proximidades de FRET. Esta última posibilidad, en nuestros experimentos, se evitó mediante el uso de una relación molar lípido:proteína alta, para asegurar que el FRET observado correspondiera a la oligomerización de la toxina en la superficie de los eritrocitos.

Para cada proteína ensayada se prepararon tres muestras: (a) D/proteína sin marcar (D/HlyA), (b) D/A, y (c) proteína sin marcar/A (HlyA/A). La relación molar entre A y D fue de 1:1.

Cuantificación del aumento de fluorescencia del aceptor por FRET.

La eficiencia de FRET (E) se calculó a partir de los siguientes datos espectrales según Gohlkey col, (1994). El espectro de emisión de fluorescencia de fantasmas de eritrocitos que contienen D/A, $F^{D/A}(480, \lambda_{em})$ (excitado a 480 nm) se expresó como la suma ponderada de los dos espectros siguientes: (a) espectro de emisión de los fantasmas de eritrocitos que contienen solo proteína marcada con D, $F^D(480, \lambda_{em})$, y (b) espectro de emisión de fantasmas que contienen proteínas marcadas con D y A, pero excitadas a la longitud de onda del aceptor, $F^{D/A}(530, \lambda_{em})$ (excitado a 530 nm).

$$F^{D/A}(480, \lambda_{em}) = a * F^D(480, \lambda_{em}) + b * F^{D/A}(530, \lambda_{em})$$

Los coeficientes a y b corresponden a los ajustes fraccionarios de las contribuciones de cada uno de los espectros; b corresponde a la señal de emisión del aceptor debida a FRET desde el donador, normalizado por $F^{D/A}(530, \lambda_{em})$. Finalmente, E se calculó a partir del coeficiente b , obtenido por los ajustes matemáticos antes mencionados, de la siguiente manera:

$$b = [E * \epsilon^D(480) / \epsilon^A(530)] + \epsilon^A(480) / \epsilon^A(530)$$

ϵ^D y ϵ^A corresponde a los coeficientes de absorción de las sondas D y A a sus correspondientes máximos de longitud de onda de absorción; $\epsilon^D(480 \text{ nm}) / \epsilon^A(530 \text{ nm})$ y $\epsilon^A(480 \text{ nm}) / \epsilon^A(530 \text{ nm})$ se determinaron a partir de los espectros de absorción de las muestras conteniendo solo D o A , ($D/HlyA$ y $HlyA/A$).

En la **Fig. 4** se puede observar un ejemplo de los espectros obtenidos para una muestra que presenta FRET, como es el caso de $HlyA$ K344C (A) y otro ejemplo de muestra que no presenta FRET como es la muestra pro $HlyA$ K344C (B), ambos estudiados en su interacción con fantasmas de eritrocitos de carnero. La **Fig. 4C** muestra la eficiencia de FRET obtenida a partir de los espectros mostrados en A y B, según se describió anteriormente.

Estos resultados demuestran que la proteína activa ($HlyA$ K344C) oligomeriza en la membrana eritrocitaria. En cambio, la proteína mutante pro $HlyA$ K344C, análoga a la anterior pero sin los ácidos grasos unidos covalentemente, no presenta FRET cuando interacciona con la membrana. Estos resultados indican que la presencia de los ácidos grasos unidos covalentemente favorece una conformación de $HlyA$ adecuada para que se produzcan las interacciones proteína-proteína. La presencia de estos ácidos grasos facilitan la exposición de regiones intrínsecamente desordenadas implicadas en diferentes pasos del mecanismo de acción (Herlax y Bakas, 2007), en este caso específicamente se le atribuye la capacidad de facilitar las interacciones proteína-proteína.

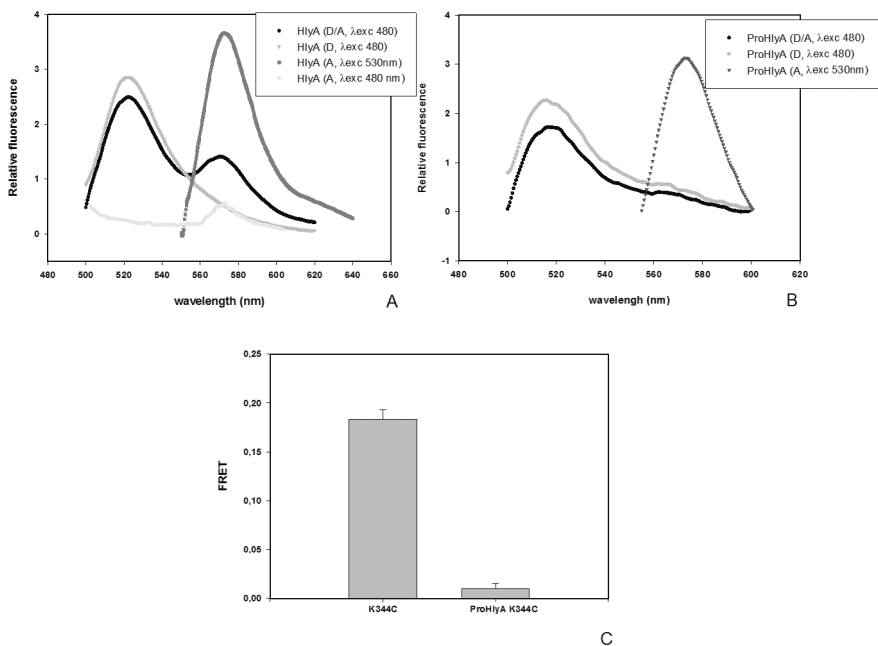


Figura 4. Ejemplo de los espectros obtenidos para una muestra que presenta FRET (A) y otra que no presenta FRET (B). Los espectros presentados son: El espectro de emisión de fluorescencia de fantasmas de eritrocitos conteniendo D/A, $F^{D/A}(480, \lambda_{em})$ (excitado at 480 nm) (●), espectro de emisión de los fantasmas de eritrocitos conteniendo solo proteína marcada con D, $F^D(480, \lambda_{em})$ (▼), espectro de emisión de fantasmas conteniendo proteínas marcadas con D y A, pero excitada a la longitud de onda del aceptor, $F^{D/A}(530, \lambda_{em})$ (excitado a 530 nm) (■). Gráficas publicadas en Herlax y col(Herlax et al., 2009).

Por otro lado, hemos realizados medidas de FRET similares a las mencionados anteriormente, pero utilizando fantasmas de eritrocitos deplecionados de colesterol por metil-β-ciclodextrina. El objetivo de estos ensayos fue el de estudiar la participación de los microdominios de membrana en el proceso de oligomerización. Los resultados mostraron un 75% de descenso de la eficiencia de FRET en los eritrocitos deplecionados de colesterol con respecto a los eritrocitos control, indicando la posible participación de los microdominios de la membrana enriquecidos en esfingomiolina y colesterol en el proceso de oligomerización (Herlax et al., 2009).

Para profundizar en el proceso de oligomerización de la toxina se realizaron ensayos de *stopped-flow*. Esta técnica espectroscópica es ampliamente usada para el estudio de los mecanismos de reacción rápida (desde 1ms hasta 100 seg) en solución. En general, los dos reactivos se mezclan y luego se detienen en una celda de observación. En nuestro caso se realizaron estudios de cinética de FRET por *stopped-flow*. Para esto se mezclaron fantasmas de eritrocitos (control y deplecionados de colesterol) con una mezcla conteniendo HlyA K344C marcada con D y A. El comportamiento bifásico del aumento de fluorescencia del aceptor en función del tiempo indica que el proceso de oligomerización ocurre en dos fases: una primera fase muy rápida de 20 seg, independiente del contenido de colesterol, ya que el aumento de fluorescencia presenta el mismo comportamiento exponencial tanto en eritrocitos control como en los deplecionados de colesterol. Por otro lado, el período entre las dos fases es dependiente del contenido de colesterol en la membrana ya que el aumento de fluorescencia del aceptor ocurre 50 segundos más tarde en los eritrocitos depletados de colesterol que en el control. La fluorescencia de A de una mezcla compuesta por HlyA K344C sin marcar con A, muestra un aumento menos pronunciado que los anteriores. Esto demuestra que la primera fase del proceso de oligomerización, descrito anteriormente, corresponde al aumento de fluorescencia de A por FRET y no a un aumento debido al incremento del rendimiento cuántico de fluorescencia por inserción de la toxina en la membrana.

Por lo tanto, de estos resultados podemos concluir que el proceso de oligomerización ocurre en dos fases: una primera fase rápida donde se forman pequeños oligómeros y una segunda fase donde estos oligómeros coalescen para formar un poro mayor. Esta segunda fase depende del contenido de colesterol en la membrana, resultado que sugiere que los dominios enriquecidos en esfingomielina y colesterol favorecen la fusión de los oligómeros.

Los resultados obtenidos a partir de las técnicas de FRET demuestran que los ácidos grasos unidos covalentemente a la proteína favorecen la oligomerización de la proteína en los microdominios de membrana, que podrían servir de plataformas de concentración de la toxina.

2.4. Caracterización de poros proteolipídicos empleando BLM

En esta sección presentamos estudios en BLM para la caracterización del poro formado por HlyA.

Las Bicapas Lipídicas Planas preparadas por la técnica de Mueller y col (1962) constituyen una de las aproximaciones experimentales más empleadas para caracterizar canales iónicos ya que permite detectar la corriente generada por el paso de iones a través de canales únicos. Los experimentos se realizan sobre bicapas lipídicas libre de solvente empleando buffer 100 mM KCl, 5–10mM Hepes, pH 7.0 a cada compartimento a cada lado de la bicapa. La toxina se añade en concentraciones del orden nM en el compartimento cis. Luego se aplica un voltaje constante a través de la membrana en el lado cis. Se mide la corriente a través de la bicapa y se realiza el cálculo de la conductancia.

$$G(nS) = I(pA) / V(mV)$$

donde I es la corriente medida a través de la bicapa y V el potencial eléctrico aplicado. Las corrientes macroscópicas se amplifican.

Varios mecanismos han sido propuestos para explicar la permeabilización de membranas inducida por toxinas y péptidos anfipáticos. Los modelos aceptados para explicar la formación de poros en el caso de toxinas de elevado peso molecular son esencialmente dos: el modelo del barril beta, cuyo prototipo es el canal formado por la α -toxina de *Staphylococcus aureus* (Gouaux, 1998), y el modelo del ramillete α -helicoidal, como el formado por las colicinas (Bermejo et al., 2013) y δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (Promdonkoy y Ellar, 2003). La conductancia en estos casos muestra típicos escalones cuya conductancia refleja el tamaño del poro formado.

En sistemas lipídicos puros, la ruptura irreversible de la bicapa por la aplicación de un campo eléctrico resulta del crecimiento de poros lipídicos cuando estos alcanzan un radio crítico (Chernomordik y Chizmadzhev, 1989). La dependencia experimental del tiempo de vida media de la membrana (en un promedio de 10 medidas) con el voltaje aplicado U puede ajustarse con la expresión teórica basada en la teoría general para la formación de poros lipídicos bajo acción de un campo eléctrico

$$t_1 = A \exp\left\{\frac{\pi \gamma^2}{kT(\sigma + C[\epsilon_w/\epsilon_m - 1]U^2)}\right\}$$

donde γ es la tensión lineal del poro en la membrana. Este es un parámetro clave en el desarrollo de poros lipídicos ya que cuantifica el trabajo necesario para formar un poro de perímetro unitario y da una medida de la resistencia de la membrana a la ruptura.

Sin embargo, la interacción de HlyA con membranas resulta en la formación de poros proteolipídicos, los cuales comparten algunas características de los canales iónicos proteicos, tales como la selectividad iónica y la dependencia del voltaje (Sansom, 1991), y también con propiedades de los poros lipídicos como es la dependencia de la composición de la membrana (Basañez et al., 2001). Como puede verse en la **Fig. 5**, aún en membranas de asolectina, solo se observan unos pocos incrementos de conductancia a modo de escalones, típicos de los canales proteicos, siendo las fluctuaciones de conductancia las responsables del incremento observado (Bakas et al., 2006).

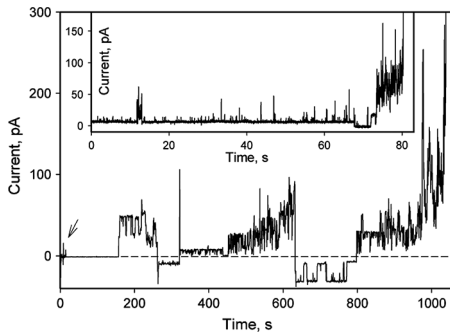


Figura 5. Efecto de HlyA sobre la conductancia de BLM. La flecha indica el agregado de 2.5 nM de HlyA a la solución acuosa del lado cis de la bicapa de asolectina. En el inserto de la figura se muestra un experimento de las fluctuaciones de conductancia. Gráfico publicado en Bakás et al., (Bakas et al., 2006)

Las conductancias obtenidas en nuestros experimentos y por lo tanto, el tamaño del poro formado, muestran una importante dependencia de la composición lipídica de la membrana, indicando la posible participación de los lípidos en la estructura del poro.

En primera instancia, no es posible descartar la posibilidad que el poro sea proteico pero sensible a la naturaleza de los lípidos que lo rodean; sin embargo, las medidas de tiempo de vida media de las membranas apoyan el modelo del poro proteolipídico. HlyA provoca una disminución del tiempo de vida media de la membrana, tal como lo establece la teoría de los poros lipídicos inducidos por un potencial transmembrana (Abidor et al., 1979). Este comportamiento no se espera en el caso de la inserción de poros puramente proteicos, los cuales tienen poco efecto sobre el tiempo de vida media de la membrana.

En el caso de las proteínas proapoptóticas Bax (Basañez et al., 2002), el péptido C-terminal de la glicoproteína de cubierta de HIV (Chernomordik et al., 1994) o la proteína PB1-F2 del virus de influenza A (Chanturiya et al., 2004) se forman poros lipídicos en la membrana, cuya formación se promueve por la presencia de lípidos que inducen una curvatura positiva mientras que los lípidos inductores de curvatura negativa inhiben su formación. Se demostró que HlyA ejerce un potente efecto desestabilizador sobre la membrana, disminuyendo la barrera de energía para el desarrollo y crecimiento del poro. Como ya ha sido sugerido para otras proteínas que desestabilizan la membrana, el desajuste hidrofóbico/hidrofílico de los lípidos en torno a la proteína reduce el costo de energía para el agrandamiento del poro, lo que es equivalente a una disminución en la tensión lineal del poro medida experimentalmente. En contraste con lo encontrado para otras proteínas desestabilizadoras de la membrana, HlyA causa una disminución en la capacitancia de la membrana para todas las composiciones lipídicas analizadas. Este efecto puede explicarse por un incremento en el espesor de la bicapa a consecuencia de la reorganización de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos, como resultado de la interacción con la toxina.

Otro aspecto interesante encontrado en la interacción de HlyA con bicapas planas es el incremento en la estabilidad de las BLM que contienen lisofosfatidilcolina (LPC). Usualmente, la LPC es un agente desestabilizador de las membranas. Una posible explicación de esta paradoja en términos de la forma molecular y de la curvatura, puede estar relacionada con el incremento del espesor de la bicapa inducido por HlyA. Generalmente, la expansión del poro y la ruptura de la membrana está facilitada por la presencia de moléculas que inducen una curvatura positiva (como los lisofosfolípidos), ya que existe una disminución en la energía por unidad de longitud (tensión lineal) requerida para formar los bordes del poro en

una membrana donde la curvatura de la monocapa es positiva, mientras que la presencia de los lípidos inductores de curvatura negativa (como el diacilglicerol y la fosfatidiletanolamina), incrementa la energía libre (por unidad de longitud) para la formación del poro. En un poro proteolipídico o toroidal, la curvatura positiva se encuentra perpendicular al plano de la membrana, mientras que la curvatura negativa está presente en el plano de la membrana alrededor del poro (Alvarez et al., 2001). Sin embargo, cuando se incrementa la longitud del poro, como se describió para HlyA, la curvatura se desplaza hacia valores negativos (**Fig. 6**), haciendo que la formación de dicho poro esté energéticamente menos favorecida en las membranas que contienen lípidos con curvatura espontánea positiva. En

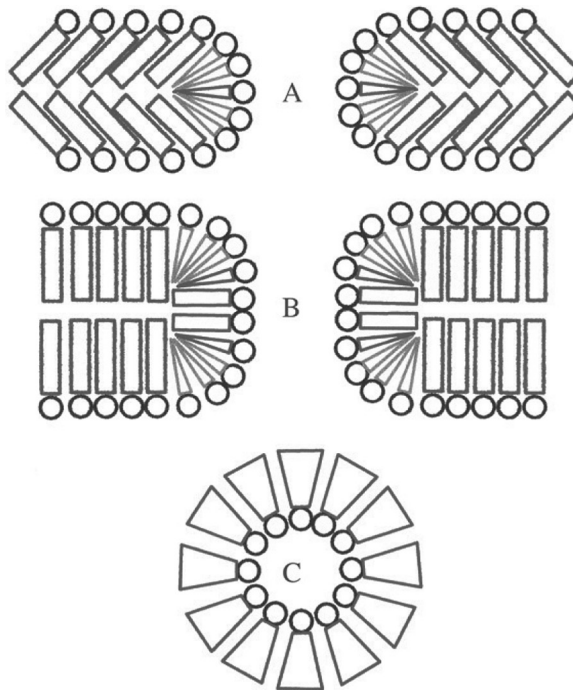


Figura 6. Esquema de la localización de diferentes lípidos en los poros de proteínas pequeñas y grandes (A y B). En C se muestra la sección transversal de la parte media del poro en el plano de la membrana. Los lípidos lamelares están representados como cilindros, los lípidos con curvatura intrínseca positiva como conos (A y B) y lípidos con curvatura negativa como trapecios (C) Esquema extraído de la publicación de Bakás et al, (Bakas et al., 2006).

otras palabras, la LPC previene la formación de partes del toroide que son predominantemente de curvatura negativa, estabilizando en consecuencia la membrana.

La dependencia encontrada de los poros de HlyA con la composición-lipídica en los estudios de BLM y el tiempo de vida media de la membrana son consistentes con los datos de permeabilidad obtenidos con liposomas (Ostolaza et al., 1993). En este sentido, los lípidos como PE y colesterol, que promueven curvatura espontánea negativa, favorecen la formación de poros de HlyA.

Estos experimentos demuestran que existe más de una manera de construir y estabilizar en la membrana un poro proteolipídico que lo que es posible imaginar por el modelo clásico de poro toroidal.

3. CONCLUSIONES

Las toxinas bacterianas han sido definidas como: “sustancias solubles que pueden alterar el metabolismo normal de las células del huésped, produciendo efectos perjudiciales en el mismo” (Schlessinger and Schaechter 1993). Sin embargo, en la última década, los investigadores han buscado la manera de obtener beneficios a partir de la toxina, de allí el aumento de las terapias basadas en toxinas. Entre estas terapias se puede mencionar la producción de inmunotoxinas. Las inmunotoxinas son proteínas quiméricas compuestas por una toxina fusionada a una proteína que reconoce específicamente un ligando sobreexpresado en células cancerosas. Considerando que a concentraciones sublétricas HlyA produce la inactivación de proteína quinasa B (PKB), proteína clave en la supervivencia de la célula huésped (Wileset al., 2008), y que no requiere su internalización a la célula para que produzca este efecto, HlyA podría ser un buen candidato para la producción de inmunotoxinas (Bakás et al., 2012).

Muchos son los conocimientos acerca de la estructura y función de HlyA que harían posible la proyección sobre su aplicación en estas terapias. Sin embargo, sería necesario el esclarecimiento de la existencia de un receptor específico así como también la caracterización del dominio de la proteína involucrado en el reconocimiento de la membrana.

REFERENCIAS

- Abidor, I. G., Arakelyan, V. B., Chernomordik, L. V., Chizmadzhev, Y. A., Pastushenko, V. F., Tarasevich, M. R., 1979. Electrical breakdown of BLM: Main experimental facts and their qualitative discussion. *Bioelectrochem. Bioenerget.* 6, 37–52.
- Alessandrini, A., Viero, G., Dalla Serra, M., Prévost, G., P. Facci, 2013. γ -Hemolysin oligomeric structure and effect of its formation on supported lipid bilayers: an AFM investigation. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 405–411.
- Alvarez, C., Dalla Serra, M., Potrich, C., Bernhart, I., Tejuca, M., Martinez, D., Pazos, F., Lanio, M., Menestrina, G., 2001. Effects of lipid composition on membrane permeabilization by sticholysin I and II, two cytolysins of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophys. J.* 80, 2761–2774.
- Anderluh, G., Beseničara, M., Kladnik, A., Lakey, J., Maček, P., 2005. Properties of nonfused liposomes immobilized on an L1 Biacore chip and their permeabilization by a eukaryotic pore-forming toxin. *Analytical Biochemistry* 344, 43–52.
- Anderluh, G., Macek P., Lakey, J. H., 2003. Peeking into a secret world of pore-forming toxins: membrane binding processes studied by surface plasmon resonance. *Toxicon.* 42, 225–228.
- Bakas, L., Chanturiya, A., Herlax, V., Zimmerberg, J., 2006. Paradoxical lipid dependence of pores formed by the *Escherichia coli* alpha-hemolysin in planar phospholipid bilayer membranes. *Biophys J.* 91, 3748–3755.
- Bakás, L., S. Maté, R. Vazquez and V. Herlax, 2012. *E. coli* Alpha Hemolysin and properties. In: Ekinci, D. (Ed), *Biochemistry*. Intech, Croacia, pp 107–140.
- Basañez, G., Sharpe, J., Galanis, J., Brandt, T., Hardwick, J., Zimmerberg, J., 2002. Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *Biol. Chem.* 277, 49360–49365.
- Basañez, G., Zhang, J., Chau, N., Maksaev, G., Maksev, I., Frolov, V., Brandt, T., Burch, J., Harwick, M., Zimmerberg, J., 2001. Pro-apoptotic cleavage products of Bcl-xL form cytochrome c-conducting pores in pure lipid membranes. *J. Biol. Chem.* 276, 31084–31091.

- Bermejo, I. L., Arnulphi, C., Ibáñez de Opakua, A., Alonso-Mariño, M., Goñi, F. M., Viguera, A. R., 2013. Membrane partitioning of the pore-forming domain of colicin A. Role of the hydrophobic helical hairpin. *Biophys J.* 105, 1432-1443.
- Besenicar, M., Anderluh, G., 2010. Preparation of lipid membrane surfaces for molecular interaction studies by surface plasmon resonance biosensors. In: N. J. de Mol and M. J. E (Eds). *Surface Plasmon Resonance. Methods and Protocols.* Fischer. Utrecht University, Utrecht, The Netherlands., Humana Press.
- Brown, A. C., Balashova, N. V., Epan, R. M., Epan, R. F., Bragin, A., Kachlany, S. C., Walters, M. J., Du, Y., Boesze-Battaglia, K., Lally, E. T., 2013. Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin utilizes a cholesterol recognition/amino acid consensus site for membrane association. *J Biol Chem.* 288, 23607-23621.
- Cavaliere, S., Bohach, G. A., Synder, I., 1984. Escherichia coli α -hemolysin characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol. Rev* 48, 326-343.
- Chanturiya, A., Basañez, G., Schubert, U., Henklein, P., Yewdell, J. W., Zimmerberg, J., 2004. PB1-F2, an influenza A virus encoded pro-apoptotic mitochondrial protein, creates variably-sized pores in planar lipid membranes. *J. Virol.* 78, 26304-26312.
- Chernomordik, L., Chanturiya, A., SussToby, E., Nora, E., Zimmerberg, J., 1994. An amphipathic peptide from the C-terminal region of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein causes pore formation in membranes. *J. Virol.* 68, 7115-7123.
- Chernomordik, L. V., Chizmadzhev, Y.U., 1989. In: Neumann, A., Jordan, C (Eds) *Electroporation of bilayer lipid membranes: phenomenology and mechanism. Electroporation and electrofusion in cell biology.* Plenum Press, New York, pp 181-192.
- Daza Millone, M. A., 2011. (tesis) *Monocapas autoensambladas de alcanotioles y α , ω -alcanoditioles sobre oro: Adsorción no específica de moléculas bioactivas, biomoléculas y vesículas,* Universidad Nacional de La Plata.
- de Mol, N. J., Fischer, M.J., 2010. Surface Plasmon Resonance: A general introduction. In: de Mol, N.J., Fisher M. J. E. (Eds) *Fischer Surface Plasmon Resonance. Methods and Protocols.* Humana Press, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands. Dhakal, B. K. Mulvey, M.A., 2012. *The UPEC*

- pore forming toxin α -Hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory and survival pathways. *Cell Host Microbe*. 11, 58-69.
- Fernández, M. M., De Marzi, M. C., Berguer, P., Burzyn, D., Langley, R., Piazzon, I., Mariuzza R. A., Malchiodi, E. L., 2006. Binding of natural variants of staphylococcal superantigens SEG and SEI to TCR and MHC class II molecule. *Molecular Immunology*. 43, 927-938.
- Forster, T., 1959. Transfer mechanisms of electronic excitation. *Discuss. Faraday Soc.* 27: 7-17.
- Gohlke, C., Murchie, A. I. H., Lilley, D. M. J., Clegg, R. M., 1994. Binding of DNA and RNA helices by bulged nucleotides observed by fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 11660-11664.
- Gouaux, E., 1998. Alpha-Hemolysin from *Staphylococcus aureus*: an archetype of beta-barrel, channel-forming toxins. *J Struct Biol*. 121, 110-122.
- Herlax, V., Bakas, L., 2007. Fatty acids covalently bound to alpha-hemolysin of *Escherichia coli* are involved in the molten globule conformation: implication of disordered regions in binding promiscuity. *Biochemistry* 46, 5177-5184.
- Herlax, V., Mate, S., Rimoldi, O., Bakas, L., 2009. Relevance of fatty acid covalently bound to *Escherichia coli* alpha-hemolysin and membrane microdomains in the oligomerization process. *J Biol Chem* 284, 25199-25210.
- Heyduk, T., 2002. Measuring protein conformational changes by FRET/LRET. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 292-296.
- Lakey, J. H., Raggett, E. M., 1998. Measuring protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol*. 8, 119-123.
- Lakowicz, J. R., Gryczynski, I., Wiczak, W., Laczko, G., Prendergast, F. C., Johnson, M.L., 1990. Conformational distributions of melittin in water/methanol mixtures from frequency-domain measurements of nonradiative energy transfer. *Biophys. Chem.* 36, 99-115.
- Marrs, C. F., Zhang, L., Foxman, B., 2005. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes. *FEMS Microbiol Lett* 252, 183-190.
- Mate, S., Vazquez, R.F., Herlax, V.S., Daza Millone, M.A., Fanani, M.L., Maggioro, B., Vela, M.E., Bakas, L.S., 2014. Boundary region between coexisting lipid phases as initial binding sites for *Escherichia coli* alpha-hemolysin: a real-time study. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 1832-1841.

- Maula, T., Isaksson, Y. J., García-Linares, S., Niinivehmas, S., Pentikäinen, O. T., Kurita, M., Yamaguchi, S., Yamamoto, T., Katsumura, S., Gavilanes, J. G., Martínez-del-Pozo, A., Slotte, J.P., 2013. 2NH and 3OH are crucial structural requirements in sphingomyelin for sticholysin II binding and pore formation in bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1828, 1390-1395.
- Mueller, P., Rudin, D., Tien, T., Westcott, W., 1962. Reconstitution of cell membrane in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature.* 194, 979-980.
- Myszka, D. G., 1997. Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Curr Opin Biotechnol.* 8, 50-57.
- Ostolaza, H., Bartolome, B., Ortiz de Zarate, I., de la Cruz, F., Goñi, F.M., 1993. Release of lipid vesicle contents by the bacterial protein toxin alpha-haemolysin. *Biochim Biophys Acta* 1147, 81-88.
- Promdonkoy, B., Ellar, D.J., 2003. Investigation of the pore-forming mechanism of a cytolytic delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem J.* 374, 255-259.
- Ros, U., Edwards, M.A., Epand, R.F., Lanio, M.E., Schreier, S., Yip, C.M., Alvarez, C., Epand, R.M., 2013. The sticholysin family of pore-forming toxins induces the mixing of lipids in membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 2757-2762.
- Sansom, M. S. P., 1991. The biophysics of peptide models of ion channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 55, 139-235.
- Schlessinger, D., Schaechter, M., 1993. *Bacterial toxins.* Baltimore, Williams and Wilkins.
- Shaw, J. E., Epand, R.F., Hsu, J.C.Y., Mo, G.C.h., Epand, R.M., Yip, C.M., 2008. Cationic peptide induced remodelling of model membranes: Direct visualization by in situ atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* 162, 121-138.
- Smith, Y. C., Rasmussen, S.B., Grande, K.K., Conran, R.M., O'Brien, A.D., 2008. Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation of mice. *Infect Immun* 76, 2978-2990.
- Vazquez, R., Maté, S., Bakás, L., Fernández, M., Malchiodi, E., Herlax, V., 2014. Novel evidence for the specific interaction between cholesterol and α -haemolysin of *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* 458, 481-489.

- Welch, R. A. , 1991. Pore-forming cytolisins of Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol* 5, 521-528.
- Wiles, T. J., Dhakal, B.K., Eto, D.S., Mulvey, M.A., 2008. Inactivation of host Akt/protein kinase B signalling by bacterial pore- forming toxins. *Molecules Biology of the cell* 19, 1427-1438.
- Won, A., Ruscito, A., Ianoul, A., 2012. Imaging the membrane lytic activity of bioactive peptide latarcin 2a. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 3072–3080.