



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

**Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas**

**Interacción Lípido-Proteína:
Mecanismo de acción de α -
hemolisina de *Escherichia coli***

Tesis Doctoral: Vanesa.S. Herlax

Directora: Dra. Laura Bakás

-AÑO 2006-

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas se realizó en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Laura Bakás.

*Dedicada a mis padres, hermanos
y a mis tres amores...
Diego, Malena y Pedro.*

Mi sincero reconocimiento

- Al Dr. Rodolfo R. Brenner y a la Dra. M. Josefa Tacconi de Alaníz quienes, como Directores del INIBIOLP, me permitieron utilizar las instalaciones del Instituto confiando plenamente en mi persona.
- A la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, por haberme permitido el uso de sus equipos e instalaciones para la realización del trabajo experimental de esta Tesis.
- Al Ministerio de Salud de la Nación y a la Agencia Nacional de Promoción de Ciencia y Tecnología (ANPCyT), por las becas que me otorgaran oportunamente.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme brindado los medios, mediante becas y subsidios, para la realización de este trabajo.

Quiero agradecer profundamente,

A Laura, quien sin conocerme me eligió para realizar este trabajo de tesis, otorgándome su confianza desde un primer momento. Quiero agradecerle la libertad de trabajo que siempre me dió lo cual me ayudó a crecer profesionalmente. También la comprensión, paciencia y dedicación que hicieron que el trabajo fuera un placer.

A la Dra. Tacconi de Alaniz por brindarme su apoyo para solicitar la beca doctoral de CONICET y así poder dedicarme full time a la realización de esta tesis.

A todo el personal del INIBIOLP, porque cada uno de ellos me ayudó con un consejo experimental o personal, con algún reactivo, con algún equipo, con la traducción de algún paper, etc.

A los integrantes del laboratorio 7 que me hicieron un lugar donde el espacio era chico pero el corazón grande. A la "tía Ana" por consentirme todo el tiempo y ayudarme con sus consejos de toda índole.... inclusive los lípidos!! A Laurita por los innumerables geles y ayudarme con el FPLC que tan poco quiero. A Ale y Horacio por sus ayudas fluorescentes y la infinidad de consejos experimentales que siempre me dieron. A Juan y Marina por cambiar algún buffer de diálisis, apagar alguna bomba, cambiar un decolorante.... A Tati por compartir el escritorio y darme una mano siempre que lo necesité.

A mis actuales compañeras de laboratorio nuevo, Flor y Sabina quienes siempre están listas para tenderme una mano, darme un consejo, levantarme el ánimo....Sa, muchas gracias por la compu, ya que sin ella los tiempo de presentación de la tesis hubiesen sido mucho mas largos.

A Omar por ayudarme a obtener el mutante Pro 345 entre protesta y protesta!!

A Mauro, Jole, Tati y Nico que me transmitieron sus experiencias en biología molecular.

Al Dr. Gende y la Dra. Bruzzone por prestarme el fluorómetro cuando el nuestro se rompió.

A Rubén por cuidarme los conejitos productores de los anticuerpos antiHlyA.

Quiero agradecer muy especialmente a mis padres que sin el apoyo incondicional de ellos nunca hubiese cumplido este sueño. Porque ellos me apoyaron siempre en cada una de las decisiones que tomé. Los quiero mucho!!!

A mis hermanos que siempre me "salvan las papas" cuando las cosas se me complican!!!

A mis abuelos por preocuparse siempre de mis cosas!!

A Diego, Male y Pedro por ser mi cable a tierra y esperarme siempre con un beso grande y un enorme abrazo. Los amo de una manera inexplicable!!!

A mis amigas Lore y Lau que siempre me apoyaron a pesar de la distancia

Y todas aquellas personas que participaron de alguna u otra manera en la realización de esta tesis y que en este momento me estoy olvidando..

Los resultados presentados en este trabajo de tesis fueron parcialmente publicados en:

“ Aplicaciones terapéuticas de toxinas líticas formadoras de poros: potencialidades de α - hemolisina de *Escherichia coli* ” **V.Herlax** y L.Bakás ; Medicina (2001),62:66-72 (artículo especial)

“Acyl chains are responsible for irreversibility in the *Escherichia coli* α -Hemolysin binding to membrane” **V.Herlax** and L.Bakás, short communication, Chem.Phys.Lipids 122 (2003) 185-190.

“Role of lipopolisaccharide on the structure and function of HlyA from *Escherichia coli*” **V.Herlax**, M..J.T de Alaniz and L.Bakás, Chem Phys Lipids. (2005) 135(2):107-115.

“ Paradoxical lipid dependence of pores formed by *Escherichia coli* α -hemolysin in planar phospholipids bilayer membranes” Bakás, L., Chanturiya, A., **Herlax, V.** and Zimmerberg, J. Biophys J. 91:3748-3755.

“ Fatty acids covalently bound to α -hemolysin of *Escherichia coli* are involved in the molten globule conformation : Implication of disorder regions in the binding promiscuity” **V. Herlax** and L. Bakás. Biochemistry (2006)(en revisión)

“ Study of the litic mechanism of associated outer membrane α -hemolysin of *Escherichia coli*” **V.Herlax**, M.F. Henning, AM, Bernasconi and L.Bakás. Archive of Biochemistry and Biophysics (enviado)

Abreviaturas:

ANS : ácido 1-anilino-8-naftalensulfónico

BLM: Bimolecular Lipid Membrane

BS³: bis(sulfosuccinimidyl) suberato

CMC: concentración micelar crítica

DOC: deoxicolato de sodio

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

GnCl: cloruro de guanidinio

HlyA: α -hemolisina de *E.coli*

KDO: ácido 2-ceto-3-deoxioctanoico

LB: Luria-Bertani

LPS: lipopolisacárido

LUV: vesículas unilamelares grandes

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MLV: vesículas multilamelares

NBD-PE: N-(7 nitro 2,1,3 benzoxadiazol-4 il fosfatidiletanolamina

PBS: buffer fosfato salino

PID: Proteínas intrínsecamente desordenadas

POPC: 1 palmitoil-2-oleil fosfatidilcolina

ProHlyA: prohemolisina

Rh-PE: rodamina fosfatidiletanolamina

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RTX : Repeats in Toxin

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil- sulfato de sodio

sulfo EGS: sulfo (etilen glicolbis (sulfosuccinimidilsuccinato))

TBS: tris-Hcl 50 mM, NaCl 150 mM, pH=7.4

TC: tris-HCl 20 mM, ClNa 150mM, pH=7.4

TCU: tris-HCl 20 mM, ClNa 150mM y urea 6M, pH= 7.4

TM: Toxinas Membranolíticas

TE: transferencia de energía

TES: 10 mM EDTA, 10% p/v sacarosa, 50 mM tris, pH=7

TFP: Toxinas formadoras de poros

TLC: Cromatografía de placa fina



TU: tris-HCl 50 mM, urea 6M, pH= 7

UH: unidad hemolítica

VME : vesículas de membrana externa

*Índice:***Capítulo I: Introducción General**

	Pág.
1. Historia acerca de “Toxinas Membranolíticas” _____	1
2. Clasificación funcional de TM _____	1
3. HlyA como modelo de las toxinas RTX _____	3
4. Síntesis, activación, secreción e interacción con células blanco de HlyA _____	5
4.A Síntesis y estructura molecular de HlyA _____	5
4.B Activación intracelular de hemolisina por HlyC _____	7
4.C Exportación de hemolisina al medio extracelular _____	8
4.D Mecanismo de acción de HlyA _____	11
5. Objetivos _____	14

Capítulo II: Materiales y Métodos generales

1. Purificación de HlyA y ProHlyA _____	15
2. Ensayos de actividad hemolítica _____	16
3. Cuantificación de proteína: Método de Bradford _____	17
4. Electroforesis en geles de poliacrilamida: SDS-PAGE _____	17
5. Producción de anticuerpos policlonales antiHly _____	18
5.1. Preparación de la muestra para inyectar _____	18
5.2. Inyección de la muestra _____	19
6. Western Blot _____	19
7. Preparación de sistemas modelo de membranas (liposomas) _____	20
8. Métodos de fluorescencia _____	20
8.1. Fundamentos generales _____	20
8.1.1. Corrimientos de Stokes _____	22
8.1.2. Transferencia de energía _____	22
8.1.3. Scattering _____	23
8.2. Fluorescencia de proteínas _____	23

Capítulo III: Rol del LPS en la estructura y función de HlyA

1. Introducción	24
2. Materiales y Métodos	
2.1 Purificación de la toxina	27
2.2 Cuantificación de KDO	27
2.3 Análisis por inmunobloting	28
2.4 Electroforesis	28
2.5 Tinción del LPS	28
2.6 Purificación del LPS	28
2.7 Reconstitución del complejo LPS-HlyA	29
2.8 Medida de espectros de emisión de los Trp	29
2.9 Desnaturalización térmica y con cloruro de guanidinio	29
2.10 Medidas del tamaño de los agregados por determinaciones de dispersión de luz	30
2.11 Medidas de actividad hemolítica en función de la concentración de Ca ⁺	30
3. Resultados y discusión	
3.1 Purificación de Hly s/ LPS	31
3.2 Espectros de emisión de los Trp	33
3.3 Estabilidad térmica y química de Hly c/LPS y Hly s/LPS	34
3.4 Reversibilidad de los agregados por medidas de dispersión de luz	36
3.5 Medida de la actividad hemolítica en función de la concentración de Ca ⁺²	37

Capítulo IV: Mecanismo alternativo de secreción de HlyA

1. Introducción	39
2. Materiales y Métodos	
2.1 Aislamiento de las vesículas de membrana externa	41
2.2 Purificación de HlyA libre	41
2.3 Microscopía electrónica- Tinción negativa	41
2.4 Composición de las vesículas	41

2.4.1	Análisis de lípidos	41
2.4.2	Análisis de proteínas y LPS	42
2.5	Ensayo de la actividad hemolítica	42
2.6	Cinética de hemólisis	42
2.7	Ensayo de fusión	43
3.	Resultados y discusión	
3.1	Aislamiento de las vesículas de membrana externa	44
3.2	Análisis del LPS de las vesículas	45
3.3	Composición lipídica	46
3.4	Perfil proteico de las vesículas	47
3.5	Determinación de la actividad hemolítica de VME y HlyA libre	48
3.6	Comparación de la eficiencia hemolítica de HlyA libre y VME-HlyA	49
3.7	Cinética de hemólisis de VME-HlyA y HlyA libre	50
3.8	Determinación del mecanismo de acción HlyA asociada a vesículas	53

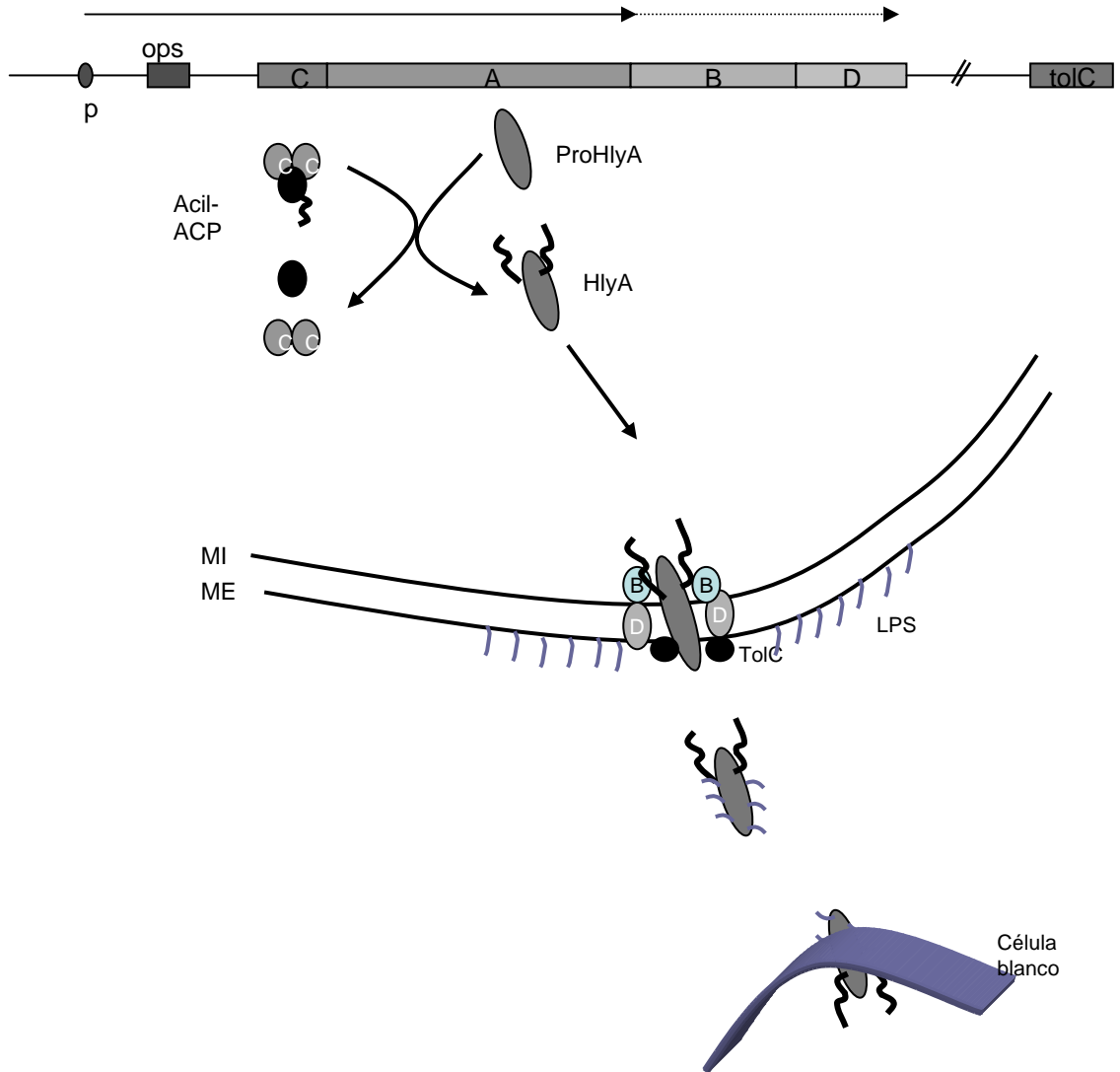
Capítulo IV: Rol de los ácidos grasos en la estructura y función de HlyA

1.	Introducción	57
2.	Materiales y Métodos	
	PARTE A: En solución	
2A.1	Purificación de proteínas	60
2A.2	Desnaturalización con GnCl	60
2A.3	Unión de ANS a HlyA y ProHlyA en solución	60
2A.4	Medida de la fluorescencia intrínseca	62
2A.5	Digestión con tripsina de HlyA y ProHlyA	62
2A.6	Predicción de regiones desordenadas	63
	PARTE B: En membranas	
2B.1	Purificación de proteínas	63
2B.1.1	Construcción de mutante PRO 345	63
2B.1.1.a	Obtención de plásmidos en escala analítica	63
2B.1.1.b	Electroforesis de inmersión en geles de agarosa	64
2B.1.1.c	Mutagénesis dirigida	65

2B.1.1.d Transformación bacteriana con los plásmidos mutados amplificados_____	66
2B.1.1.e Obtención de plásmidos en escala preparativa_____	67
2B.2 Preparación de liposomas_____	68
2B.3 Interacción de HlyA y PoHlyA con membranas _____	68
2B.4 Transferencia de las proteínas unidas a MLV de POPC a LUV de doxilo-POPC _____	69
2B.5 Cálculo del área ocupado por HlyA y ProHlyA unidas a membranas_____	69
2B.6 Marcado de los mutantes con sondas fluorescentes_____	70
2B.7 Pureza y actividad de los mutantes de HlyA_____	71
2B.8 Preparación de fantasmas de glóbulos rojos de carnero _____	71
2B.9 Depleción de colesterol de fantasmas de eritrocitos de carnero_____	72
2B.10 Unión de los mutantes de HlyA marcados, a los fantasmas de glóbulo rojo de carnero_____	72
2B.11 Medidas de transferencia de energía para estudiar la oligomerización_____	72
3. Resultados y discusión	
PARTE A: Rol de los ácidos grasos en la estructura y función de HlyA en solución	
3A.1 Purificación de ProHlyA_____	74
3A.2 Desnaturalización de HlyA y ProHlyA con GnCl _____	75
3A.3 Unión de ANS a HlyA y ProHlyA en solución_____	77
3A.4 Espectros de fluorescencia de HlyA y ProHlyA_____	80
3A.5 Medidas de TE entre Trp y ANS para HlyA y ProHlyA_____	81
3A.6 Digestión controlada con tripsina de HlyA y ProHlyA_____	82
3A.7 Predicción de regiones desordenadas de ProHlyA_____	84
PARTE B: Rol de los ácidos grasos en la estructura y función de HlyA en membranas	
3B.1 Unión de HlyA y ProHlyA a membranas_____	86
3B.2 Cálculo del área ocupado por HlyA y ProHlyA unidas a membranas_____	87
3B.3 Transferencia de las proteínas unidas a LUV de POPC a LUV de doxilo-POPC _____	89
3B.4 Purificación de proteínas _____	90
3B.5 Medida de transferencia de energía de los distintos mutantes de	

cisteína de HlyA para estudiar el proceso de oligomerización	92
3B.6 Influencia de los raft en el proceso de oligomerización	95
Discusión general	97
Conclusiones	106
Bibliografía	107

Capítulo I



Introducción

Capítulo I: Introducción General

1. Historia acerca de “Toxinas Membranolíticas”

De las aproximadamente 350 toxinas proteicas producidas por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Alouf, 2000), al menos 115 (35%) pertenecen al grupo de las llamadas “Toxinas Membranolíticas” (TM). La característica más saliente de estos efectores es la desorganización que producen en la bicapa fosfolipídica de la membrana plasmática de células humanas y/o animales. La pérdida de la integridad de la membrana origina un desbalance osmótico, reflejado por la hinchazón de la célula debido al ingreso de agua y una disipación del gradiente electroquímico que conduce a la lisis y muerte celular (Alouf, 1977), (Bernheimer, 1970), (Arbuthnott, 1982), contribuyendo a la virulencia de la bacteria y jugando un rol importante en la patogenia bacteriana tanto en humanos como animales.

Las TM fueron identificadas por su característica de lisar glóbulos rojos sensibles de humanos u otra especies animales, y por la aparición de un halo de hemólisis alrededor de las colonias bacterianas crecidas en agar sangre. Sin embargo, actualmente se sabe con certeza que la mayoría, por no decir todas, las hemolisinas bacterianas actúan sobre células distintas a los glóbulos rojos, causando daño tisular o muerte de muchos de los animales de experimentación, justificando así su nombre de “toxina” (Alouf, 2001). Es por esta razón, que Alan Bernheimer, pionero en el campo de las TM, propuso el término “citotoxina” o “toxina citolítica” para describir correctamente el rango de sus actividades biológicas (Bernheimer, 1970).

2. Clasificación funcional de TM

Los avances en el estudio del mecanismo de acción de estas toxinas sobre células blanco, ha permitido clasificarlas en tres grandes grupos: ((Arbuthnott, 1982), (Bernheimer and Rudy, 1986), (Balfanz et al., 1996))

- Toxinas que hidrolizan enzimáticamente los fosfolípidos constituyentes de las membranas de células eucarióticas: la mayoría de estas toxinas tienen actividad fosfolipasa C, algunas de ellas son Zn metalofosfolipasas, o tienen actividad esfingomielinasa. Ejemplo de este grupo son la toxina β de *Staphylococcus aureus* y la hemolisina de *Vibrio dansela*.

- Toxinas que actúan como detergentes (surfactantes): producen la solubilización de la membrana y/o se insertan parcialmente dentro de las regiones hidrofóbicas de las membranas de células blanco. Como ejemplos podemos citar la surfactina de *Bacillus subtilis*, y la hemolisina termoestable de *Pseudomonas aeruginosa* (Rowe and Welch, 1994).
- “**Toxinas formadoras de poros**” (TFP) : constituyen la gran mayoría (75-80 citolisinas) de las 115 TM descritas.

Los poros, estructuras que permiten la comunicación de dos volúmenes que se encontraban separados por una membrana biológica, pueden clasificarse dentro de tres categorías:

- canales iónicos formados por proteínas (Song et al., 1996)
- poros producidos por la fusión de membranas inducidos por la interacción con proteínas ((Kuzmin et al., 2000), (Lentz and Lee, 1999))
- complejos proteo-lipídicos (Peters et al., 2001)

En particular las TFP pueden clasificarse en α o β -TFP según el poro este formado por la inserción de α hélices anfipáticas o por barriles β .

A este grupo pertenecen las toxinas membranolíticas RTX (**R**epeats in **T**oxin), las que pueden clasificarse en dos categorías: las **hemolisinas**, que atacan una variedad de tipos celulares y las **leucotoxinas**, que presentan especificidad con respecto al tipo de célula y especie (Lally et al., 1999). Estas citolisinas incluyen al menos 19 toxinas producidas por bacterias Gram negativas tales como α -hemolisina de *Escherichia coli*, adenilato-ciclasa de *Bordetella pertussis* (CyaA), leucotoxina de *Pasteurella haemolytica* (LktA), leucotoxina de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (AktA), hemolisina y citolisina de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA), hemolisinas de *Proteus spp* y *Morganella morganii*, ((Coote, 1996), (Welch, 1991)) y las recientemente incorporadas toxina enterohemorrágica (EhxA) *Escherichia coli* O157:H7 (Bauer and Welch, 1996) y la toxina secretada por *Vibrio cholera* (Lin et al., 1999). Todas estas toxinas (hemolisina y/o leucotoxinas) comparten características genéticas, estructurales y funcionales, siendo **α -hemolisina (HlyA) de *E.coli*** el prototipo del grupo.

El estudio de este grupo de toxinas es interesante desde el punto de vista estructural, ya que deben sufrir cambios conformacionales para pasar de un estado

soluble en medio acuoso, generalmente monomérico a una estructura oligomérica inserta en la membrana.

3. HlyA como modelo de las toxinas RTX

HlyA es una toxina proteica que ciertas cepas patógenas de *E.coli* secretan específicamente al medio. Está demostrado que la toxina es un factor importante en la virulencia de esta bacteria en enfermedades como meningitis, septicemia e infecciones urogenitales (Welch et al., 1981), (Hughes et al., 1983), (Cavalieri et al., 1984). Recientemente se la ha encontrado asociadas a diarreas humanas, aunque aún no se ha dilucidado su función en el desarrollo de la enfermedad (Elliott et al., 1998). También se han aislado cepas de *E. coli* productoras de HlyA en la mucosa del íleon de pacientes con la enfermedad de Crohn, afección inflamatoria crónica segmentaria del tubo digestivo, de etiología desconocida y que evoluciona de modo recurrente con brotes y remisiones, presentando diversas complicaciones y manifestaciones extradigestivas. Si bien no se ha dilucidado la función de HlyA, ésta podría romper la barrera intestinal y participar en el proceso inflamatorio de la enfermedad (Darfeuille-Michaud et al., 1998).

HlyA se sintetiza y se secreta al medio en fase exponencial de crecimiento de la bacteria tanto en condiciones anaeróbicas como aeróbicas, aunque en este último caso la producción es mayor (Mouriño et al., 1994). En fase estacionaria la actividad decrece en el sobrenadante debido a la agregación de la proteína (Ostolaza et al., 1991).

La toxina activa puede causar la muerte de varios tipos celulares. En un principio se pensó que su principal función era lisar los eritrocitos, de ahí su nombre, pero estudios posteriores aseguran que a concentraciones bajas, sublépticas, ataca a las células del sistema inmune del hospedador (Menestrina et al., 1995), (Coote, 1996), (Coote, 1992). Las ventajas que HlyA ofrece a la bacteria pueden ser las de actuar como mecanismo de defensa frente a las células encargadas de la respuesta inmune humoral del huésped, a bajas concentraciones como las que existen lejos del primer foco de infección. A altas concentraciones, en la cercanía de la bacteria invasora, la toxina podría estar involucrada en la lisis de macrófagos para evitar así la destrucción bacteriana y al mismo tiempo causar la lisis de eritrocitos como fuente de hierro y otros nutrientes para la bacteria (Lebek and Gruening, 1985).

HlyA se sintetiza en el citoplasma a partir de un operón que contiene cuatro genes, *hlyCABD*. El gen estructural *hlyA* da lugar a la proteína de 1024 aminoácidos que no es tóxica hasta que es activada intracelularmente por el producto del gen *hlyC* y extracelularmente por Ca^{+2} . HlyA se secreta al medio inmediatamente después de su síntesis por una ruta de transporte específica formada por HlyB, HlyD y TolC.

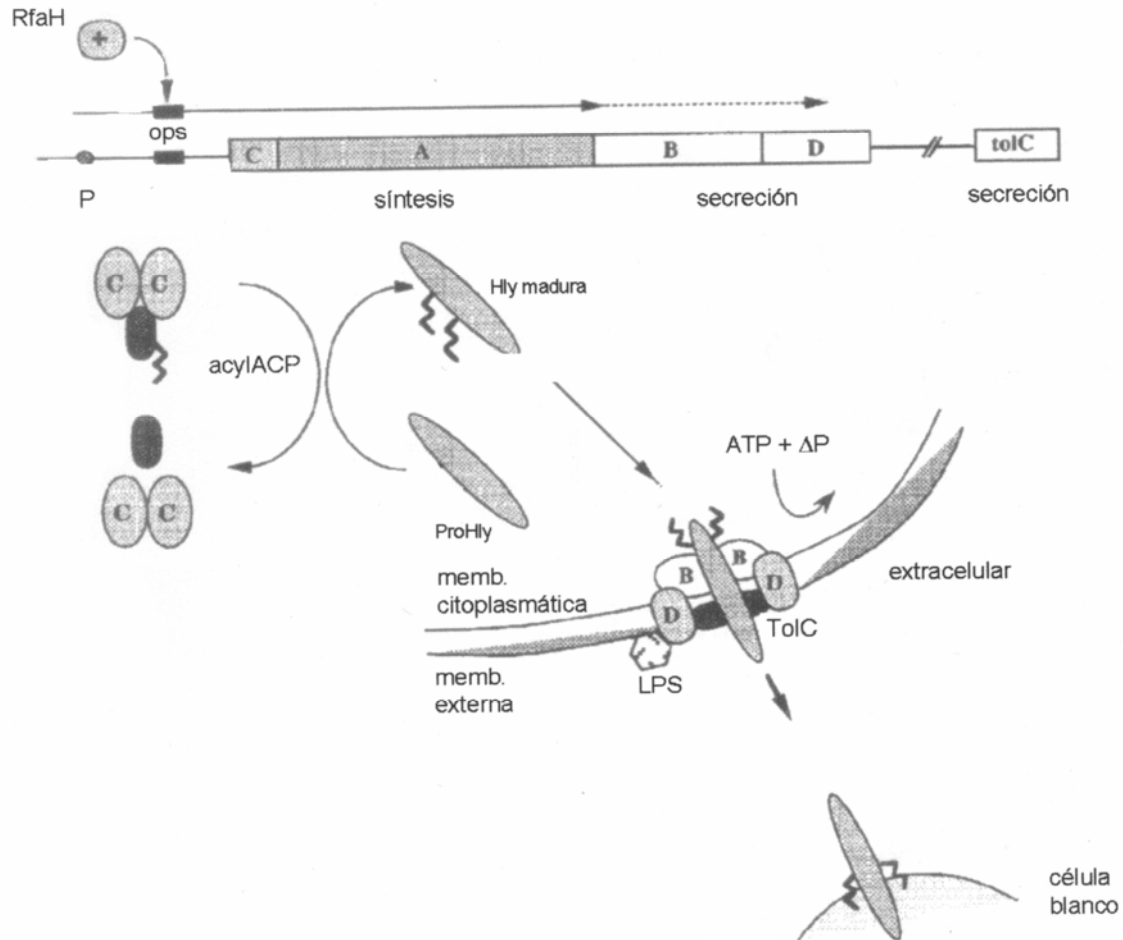
El grupo de las toxinas RTX comparten similitudes estructurales:

- la región de unión al Ca^{+2} , compuesta por un nonapéptido de secuencia GGXGXDXLX repetido un número variable de veces dependiendo de la toxina y que da lugar al nombre RTX (**R**epeats in **T**oxin)
- la activación por HlyC
- el sistema de transporte con sus propias proteínas específicas y con la señal de reconocimiento en el extremo carboxilo terminal.

Si bien comparten gran similitud estructural, funcionalmente parecen ser más dispares respecto a su especificidad por las células diana. Estudios realizados utilizando toxinas híbridas, creadas por el intercambio de posibles dominios involucrados en la especificidad de HlyA, LktA, ApxIIA y AktA, revelaron que la especificidad de estas toxinas no se debe a una característica única (Forestier and Welch, 1991).

La designación original de RTX es confusa, porque inmediatamente después de encontrar estas características comunes para agrupar las toxinas, se encontró otra clase funcional de exoproteínas no tóxicas que comparten las características antes mencionadas (Young and Holland, 1999). Es por eso que actualmente es necesario designarle a estas toxinas una categoría dentro de las proteínas secretadas por el sistema de secreción tipo I, de manera de diferenciarlas de aquellas otras proteínas RTX que tienen actividad proteasa, lipasa, unión a grupo hemo, o bactericida ((De Maagd et al., 1989), (Akatsuka et al., 1997)).

4. Síntesis, activación, secreción e interacción con células blanco de HlyA: (Stanley et al., 1998)



4.A Síntesis y estructura molecular de HlyA

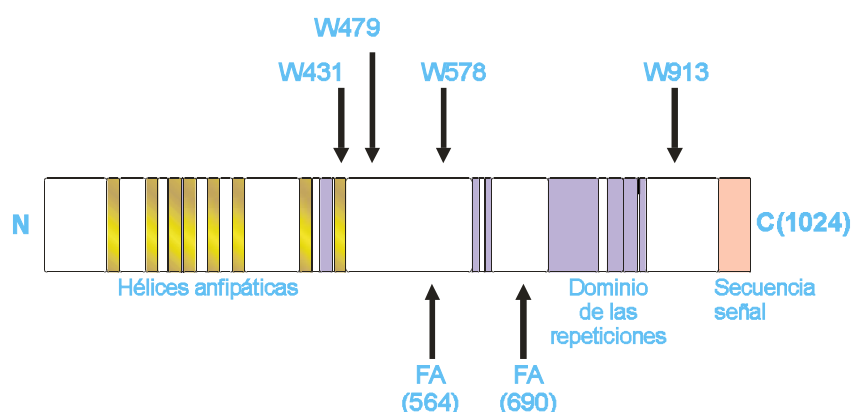
Cuatro de los genes necesarios para la síntesis y secreción de la toxina activa están organizados en el operón *hly*. Los determinantes *hly* de cepas de *E.coli* aisladas de animales están localizados en grandes plásmidos transmisibles, mientras que si proceden de humanos residen en el cromosoma (Muller et al., 1983).

Todos los genes son transcritos desde una región promotora en el extremo 5' de *hlyC*, pero mientras que HlyC y HlyA son producidas a altos niveles, HlyB y HlyD están presentes en la membrana a muy bajos niveles. La regulación que reduce la expresión de los genes de exportación está basada en la presencia de una señal de terminación de la transcripción al final de *hlyA* (Koronakis et al., 1988), siendo mas

estable el transcripto corto *hlyCA* que el largo *hlyCABD*. Además existe otro mecanismo regulador que comprende la proteína RfaH (Bailey et al., 1992) y la secuencia del ADN *ops* (operon polarity supresor) (Nieto et al., 1996). Este nuevo sistema de regulación génica está presente en un amplio rango de bacterias, afectando a la expresión de genes importantes en la virulencia y en la adaptación bacteriana (Stanley et al., 1998).

Se han realizado estudios *in vitro* para determinar la influencia de los factores ambientales en la regulación génica de la virulencia en patógenos, pero no está clara su importancia *in vivo*. Se postula que podría ser ventajoso para la bacteria, no expresar ciertos factores asociados a la virulencia en diferentes etapas de la infección para evitar la respuesta inmune del hospedador (Coote, 1992).

El gen estructural *hlyA* da lugar a una cadena polipeptídica de 1024 aminoácidos. El pI estimado para esta proteína es ácido (4.5) siendo ésta una característica común de las toxinas RTX. Como el extremo N-terminal es rico en aminoácidos positivos, para tener un pI ácido el extremo C-terminal debe ser rico en aminoácidos cargados negativamente. Si bien no se sabe con exactitud la función de esta característica química, parecería ser que el extremo N-terminal iniciaría el contacto con la célula blanco por interacciones electrostáticas con las cargas negativas de la membrana plasmática (Welch, 2001). Por distintos estudios mutacionales y de predicción de estructura a partir de la secuencia primaria ((Felmlee et al., 1985), (Hess et al., 1986)) se han definido 5 regiones importantes en la proteína:



- Una α hélice anfipática en el extremo amino terminal (Erb et al., 1987) con afinidad por membranas. Sin embargo, la delección de 29 residuos (9-37) da lugar a una toxina con una mayor actividad hemolítica (Ludwig et al., 1991).

- Tres dominios hidrofóbicos: el primero (240-260) posee un único residuo polar, Asp 243, que es esencial para la actividad lítica (Ludwig et al., 1991). Sustituciones en el segundo (299-327) y en el tercero (370-400) de aminoácidos apolares por polares o deleciones, anulan la actividad ((Ludwig et al., 1987), (Oropeza-Wekerle et al., 1992)). Para este dominio se ha predicho una estructura de barril formado por 8 α hélices ((Ludwig et al., 1991), (Benz et al., 1992)). Sin embargo, estudios posteriores de predicción de estructura, han postulado la presencia de 9 hélices anfipáticas formadas por 17-20 aminoácidos ubicadas en la región N-terminal entre las posiciones 91-433, responsables de la interacción con la monocapa externa de la bicapa lipídica de membranas (Soloaga et al., 1999). Estudios recientes utilizando liposomas marcados con una sonda fotoactivable han identificado, que la región 177-411 es la región de la proteína que se inserta en la membrana (Hyland et al., 2001).

- Dos regiones alrededor de los residuos Lys564 y Lys690 de aproximadamente 50-80 aminoácidos, necesarias para el reconocimiento de HlyC en la activación intracelular de la toxina (Standley et al., 1996).

- El dominio de unión al Ca^{+2} localizado entre los residuos 600 y 900, que consiste en 11 repeticiones de un nonapéptido cuya secuencia consenso es GGXGXDXUX. Una proteína mutante que ha perdido una única repetición es todavía hemolíticamente activa a elevadas concentraciones de Ca^{+2} . Mientras que la eliminación de tres o más repeticiones da lugar a una completa pérdida de la actividad (Ludwig et al., 1988).

- En los últimos 60 aminoácidos de la cadena polipeptídica se encuentra la región implicada en el transporte extracelular de la toxina, que consiste de dos hélices α separadas por 8-10 aminoácidos cargados que actúan como puente (Hui et al., 2000). Esta estructura secundaria es esencial para su transporte, ya que se encontró en la leucotoxina de *Pasteurella hemolytica*, la cual no presenta demasiada homología en su estructura primaria con HlyA, pero sí en su estructura secundaria (Zhang et al., 1993).

4.B Activación intracelular de hemolisina por HlyC

HlyA se sintetiza por el operón *hlyCABD* como un precursor no tóxico, **prohemolisina (ProHlyA)**, el cual se activa en el citoplasma por un proceso post-traducciona. La maduración se lleva a cabo por la adición de ácidos grasos, vía uniones

amida, a dos residuos internos específicos: lisinas K564 (KI) y K690 (KII). Esta activación está dirigida por la cosintetizada HlyC, una aciltransferasa de 20 kDa, homodimérica, que utiliza la proteína transportadora de acilos (ACP) como dadora de los ácidos grasos, mayoritariamente mirístico ((Hardie et al., 1991), (Issartel et al., 1991), (Hughes et al., 1992), (Standley et al., 1996), (Ludwig et al., 1996)). La acilación catalizada por HlyC es una reacción exotérmica a expensas de una entalpía negativa. La reacción cuya cinética sigue un mecanismo ping-pong, se caracteriza por dos reacciones parciales. La primera consiste en la formación del intermediario acil-HlyC, y la segunda, la transferencia energéticamente desfavorable del ácido graso desde el complejo acil-HlyC a ProHlyA. De los dos sitios de acilación se requiere del sitio K564 intacto para que la reacción de acilación sea termodinámicamente estable, mientras que la acilación del sitio K690 es imprescindible para la actividad de la toxina (Worsham et al., 2005). Esta maduración aumenta la hidrofobicidad de la proteína pero no es necesaria para la exportación (Ludwig et al., 1987). Sustituciones de las dos lisinas confirmaron que son los únicos sitios de acilación en la proteína (Standley et al., 1994).

Todos los miembros de la familia de toxinas RTX requieren una maduración intracelular similar de la protoxina (Welch, 1991).

La acilación dependiente de ACP es diferente de los ejemplos conocidos de acilación en la maduración de proteínas. En procariotas las proteínas con grupos acilo unidos covalentemente no son abundantes, pero en virus y eucariotas hay un amplio rango de proteínas modificadas con ácidos grasos mediante uniones oxiéster o tioéster a serinas, treoninas o cisteínas, o a través de uniones amida a glicinas amino terminal. Solamente se conoce unas pocas proteínas eucariotas que tienen al igual que las proteínas de la familia de la hemolisina ácidos grasos unidos por enlaces amida a residuos lisina no terminales, como ser el receptor nicotínico de acetilcolina, citocromo C oxidasa, receptor de la insulina, cadena pesada de la inmunoglobulina μ , factor α de necrosis tumoral, precursores de la interleukina 1α y 1β . Sin embargo, en estos casos el donante no es la ACP sino los acil-CoA (Stanley et al., 1998).

4.C Exportación de hemolisina al medio extracelular

La secreción de proteínas a través de la membrana citoplasmática y de la membrana externa de bacterias Gram-negativas se lleva a cabo generalmente por un

sistema dependiente de las proteínas *sec*, que necesita una secuencia guía en el extremo amino terminal de la proteína y que supone un intermediario periplasmático. La exportación de HlyA es diferente, ya que esta gobernada por las proteínas HlyB y HlyD, que se coexpresan con los genes del operón *hly*, y TolC. HlyB es una proteína de 80 kDa (707 aá) que se localiza en la membrana citoplasmática, y pertenece a la familia de ATPasas transportadoras (ATP binding cassette) ((Holland and Bligh, 1999), (Saurin et al., 1999)). Está compuesta por un dominio de ocho α -hélices hidrofóbicas a través de los cuales se inserta en la membrana, un dominio citoplasmático que une ATP y otro dominio mas pequeño periplasmático ((Wang et al., 1991), (Gentschev and Goebel, 1992)). HlyD es una proteína de 54 kDa que se aísla también en la fracción de membrana y pertenece a la familia “Proteínas de Fusión de Membrana” (Dinh et al., 1994). Consta de un solo dominio transmembrana que ancla la proteína a la membrana, un pequeño dominio citoplasmático (extremo N-terminal) y un gran dominio C-terminal periplasmático (Schulein et al., 1992). TolC es una proteína de la membrana externa de la bacteria, codificada por un gen cromosómico no relacionado con el operón *hly* con carácter de porina ((Létoffé et al., 1990), (Wandersman and Delepelaire, 1990), (Benz et al., 1993)). Mediante el análisis de su estructura cristalina se determinó que forma un trímero con un dominio periplasmático (Koronakis et al., 2000).

La señal para la exportación se encuentra en los últimos 60 aminoácidos de HlyA (Chevaux and Holland, 1996) y no sufre procesamiento. El mecanismo de secreción es el siguiente: HlyA interacciona con la región citoplasmática del complejo pre-formado entre HlyB-HlyD; esta unión induce cambios conformacionales que hacen que HlyD interaccione con TolC ubicada en la membrana externa (Thanabalu et al., 1998). Koronakis *et al.* (Koronakis et al., 2000) sugieren a partir de la estructura cristalina de TolC un posible modelo de interacción entre TolC-HlyD. El trímero de HlyD tiene un peso molecular muy similar al trímero de TolC, lo que indicaría que pueden formar un cilindro de diámetro idéntico. De este modo HlyA puede moverse desde HlyD a TolC vía un canal continuo. La energía necesaria para que este proceso se lleve a cabo lo proveen la hidrólisis de ATP mediada por HlyB (Koronakis et al., 1995) y la fuerza impulsora del gradiente electroquímico de protones (Koronakis et al., 1991).

Este sistema de transporte está compartido por al menos 15 proteínas pertenecientes a la familia de las toxinas RTX y a la familia de las proteasas Ca^{+2} -dependientes de patógenos Gram-negativos.

En los últimos tiempos muchos grupos de investigación se han dedicado a estudiar este sistema de transporte, dado su interés desde el punto de vista biotecnológico, para conseguir productos extracelulares en forma de proteínas quiméricas y en la producción de vacunas (Gentshev et al., 2002).

Por otro lado las bacterias Gram negativas estudiadas, incluyendo *Bordetella pertussis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Helicobacter pylori* y *Shigella flexneri* liberan de su superficie vesículas de membrana externa (VME) durante su crecimiento. La liberación de estas vesículas puede aumentar cuando las bacterias son sometidas a situaciones de estrés como exposición a algún antibiótico o simplemente crecer en suero. Aunque no ha sido posible estudiar la liberación de éstas vesículas *in vivo*, partículas similares a éstas se han detectado en plasma de pacientes con diferentes procesos infecciosos (Beveridge, 1999), (Horstman and Kuehn, 2000), (Devoe and Gilchrist, 1973), (Keenan et al., 2000), (Fiocca et al., 1999), (Kato et al., 2002), (Wai et al., 1995), (Wai et al., 2003).

Asociadas a estas vesículas se han encontrado otras toxinas RTX como Hlyadenilato ciclase de *Bordetella pertussis* (Hozbor et al., 1999) y leucotoxina de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Kato et al., 2002), pero aún no se ha estudiado la liberación de HlyA por esta vía alternativa.

Todas las bacterias Gram-negativas tienen asociada a su membrana externa el lipopolisacárido (LPS), formando una barrera impermeable a parte de conferirle un cierto carácter hidrofílico a la membrana. La estructura del LPS de *E.coli* fue estudiada por Schnaitman and Klena (Schnaitman and Klena, 1993). Esta molécula tiene propiedades anfipáticas y consiste en:

- Una región hidrofóbica, rica en ácidos grasos, llamado lípido A
- Un centro (core) altamente cargado e hidrofílico que contiene ácido 2-ceto-3-deoxioctanoico (KDO) unido a grupos fosfatos y etanolamina
- Una región polar rica en polisacárido, llamada antígeno O.

El LPS interacciona con numerosas biomoléculas incluyendo fosfolípidos, membranas y proteínas séricas, por eso no es sorprendente que durante la exportación de HlyA al medio extracelular ésta se excrete asociada al LPS. El LPS puede ser necesario para la máxima producción de algunas toxinas RTX y también puede actuar como un cofactor necesario para alguno de sus efectos biológicos (Czuprynski and Welch, 1995).

Ostolaza *et al* (Ostolaza et al., 1991) purificaron HlyA por cromatografía de exclusión molecular y de intercambio iónico y demostraron la existencia de LPS asociado a las fracciones activas de HlyA. Bohach and Snyder (Bohach and Snyder, 1985) mostraron que fracciones hemolíticamente activas de HlyA purificadas del medio de cultivo, interaccionan con anticuerpos monoclonales anti-HlyA y con anticuerpos anti-LPS, lo que indica que HlyA y LPS pueden existir en forma de complejo.

Muchos genes involucrados en la síntesis de LPS han mostrado afectar la expresión de HlyA, como mutaciones en *rfaC* (Bauer and Welch, 1997). Por otro lado, HlyA purificada de bacterias que contienen LPS-rugoso presentan su actividad lítica disminuída comparada con una cepa de LPS-liso ((Bauer and Welch, 1997), (Standley et al., 1993), (Wandersman and Letouffe, 1993)), indicando que la estructura del LPS está directamente relacionado con la actividad lítica de HlyA.

A pesar de los trabajos hasta ahora publicados no se conoce exactamente el rol del LPS en la estructura y función de HlyA.

4.D Mecanismo de acción de HlyA

Las primeras observaciones de la acción de HlyA se realizaron con cultivos bacterianos de *E.coli* crecidos en placas de agar-sangre por la visualización de zonas de hemólisis alrededor de las colonias. Han tenido que pasar varios años para que la lisis de eritrocitos sea vista como una función secundaria de HlyA (Coote, 1996). Su principal papel como factor de virulencia es modular la respuesta inmune del hospedador. A altas concentraciones, HlyA mata células inmunes efectoras dañando los tejidos y desencadenando una respuesta secundaria inflamatoria. A concentraciones sublétricas promueve la liberación de mediadores inflamatorios de granulocitos y monocitos, daña células endoteliales comprometiendo al sistema inmune humoral por inhibición de la proliferación de linfocitos y de la presentación de antígenos por macrófagos ((Seeger et al., 1989), (Suttorp et al., 1990), (Bhakdi et al., 1990), (Grimminger et al., 1991), (Bhakdi and Martin, 1991), (Jonas et al., 1993), (Koning et al., 1994), (Menestrina et al., 1996)). A estas concentraciones HlyA también es un potente disparador de la generación de inositol trifosfato y diacilglicerol, dependiente de proteína G, en granulocitos y células endoteliales (Bhakdi and Martin, 1991), (Grimminger et al., 1997).

Dejando aparte la importancia biológica, HlyA, como otras toxinas proteicas, representa un modelo para estudiar la inserción de proteínas inicialmente hidrosolubles en membranas lipídicas, un suceso que está frecuentemente ligado a la oligomerización (Bhadki et al., 1996).

Cuando HlyA se encuentra en el medio extracelular donde normalmente la concentración de Ca^{+2} es muy superior a la del medio interno (Gangola and Rosen, 1987), se lleva a cabo la activación por Ca^{+2} . Todavía no se conoce el efecto exacto que produce el Ca^{+2} en la toxina, pero se ha visto que existen cambios conformacionales y estructurales por efecto de éste catión (Bakás et al., 1998). La asociación estable de la toxina con las células diana parece requerir del dominio de las repeticiones y Ca^{+2} , aunque mutantes que carecen la mayoría de las repeticiones aún pueden asociarse con células susceptibles (Bauer and Welch, 1996). La delección de un pequeño número de repeticiones puede ser compensado por el aumento en la concentración de Ca^{+2} en los ensayos funcionales ((Ludwig et al., 1991), (Rowe et al., 1994)).

En cuanto a la interacción con las células blanco, existen al menos dos fases en la citotoxicidad de HlyA: una fase de adsorción pasiva a la superficie de la célula y luego una fase de inserción a la membrana. Por estudios con liposomas se determinó que la fase de adsorción reversible está gobernada por fuerzas electrostáticas y que esta adsorción no necesariamente conduce a la lisis celular ((Ostolaza et al., 1997), (Bakás et al., 1996)). En el modelo de unión a membranas de HlyA propuesto por Welch (Welch, 2001), la porción N-terminal compuesta por aminoácidos cargados positivamente parecerían ser los iniciadores de la unión. Luego la contribución hidrofóbica de las α -hélices anfipáticas y los ácidos grasos serían necesarios para insertar la toxina en la membrana de la célula blanco.

La existencia de un receptor para HlyA en las membranas de las células diana es el punto de mayor controversia hasta la fecha. Aunque en membranas lipídicas puras la toxina es activa, se han encontrado receptores en las membranas de algunas células blanco. En los eritrocitos el receptor es la glicoforina, proteína mayoritaria en la membrana de éstos. Los eritrocitos son lisados por concentraciones de HlyA 1-2 órdenes de magnitud menores que los necesarios para producir la liberación del contenido de liposomas, poniendo así en evidencia la existencia de un receptor de alta afinidad (Cortajarena et al., 2001). Comparando las secuencias de las toxinas RTX se encontró que existe una región altamente conservada en el extremo C-terminal, residuos

914-936 en HlyA, responsable de la interacción con glicoforina (Cortajarena et al., 2003).

Recientemente Valeva *et al* (Valeva et al., 2005) demostraron que HlyA no necesita de un receptor para lisar los eritrocitos. Si bien estos resultados parecerían contradecir los anteriores, no es así, ya que en este trabajo utilizaron eritrocitos de conejo y éstos no poseen glicoforina (Ligi et al., 1988).

Otro de los receptores descritos para HlyA son CD11a y CD18, subunidades de LFA-1 (lymphocyte-function-associated antigen 1), una β_2 integrina que se encuentra en la mayoría de los leucocitos circulantes (Lally et al., 1997). LFA-1 media la unión de los leucocitos a las células endoteliales por unión a las moléculas de adhesión intercelular de la familia ICAM, función crítica para la migración de los leucocitos durante la respuesta inflamatoria. Además LFA-1 está involucrado en la unión de las células T citotóxicas a las células blanco, proliferación de células T inducidas por antígeno e interacciones entre las células T y B. La interacción entre la toxina y LFA-1 produciría la destrucción de las células de respuesta inmune del huésped.

Como se mencionó antes HlyA es una toxina lítica, sin embargo el mecanismo por el cual se produce la lisis también es un punto de gran controversia. Menestrina *et al.* encontraron que HlyA forma poros en bicapas lipídicas planas compuestas por fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina (5:1), y que no requiere de la presencia de lípidos con cargas negativas en la membrana. Estos autores sugieren que una molécula de HlyA o agregados formados en solución se pueden unir a la membrana y formar el poro. Una vez unida a la membrana, HlyA se comporta como una proteína intrínseca y no puede ser desprendida por perfusión con una solución libre de toxina. El poro formado tiene una alta conductancia, selectividad catiónica, y un complejo mecanismo de cierre y apertura, fluctuando entre estado totalmente abiertos, estados de baja conductancia y estados totalmente cerrados ((Menestrina et al., 1987), (Ropele and Menestrina, 1989)).

Otra alternativa propuesta por Soloaga *et. al* (Soloaga et al., 1999) es que HlyA desestabiliza la membrana plasmática actuando como un detergente, desestabilizando solo la monocapa externa de la bicapa lipídica. Otros resultados que contradicen el concepto de formación de un poro estático fueron los resultados encontrados por Moayeri and Welch (Moayeri and Welch, 1994). Ellos observaron que el grado de protección osmótica aportado por protectores de distintos pesos moleculares dependía de la cantidad de toxina agregada y de la duración del experimento.

Recientes estudios empleando BLM (Bimolecular Lipid Membrane) realizados por Bakás *et. al.* demuestran la formación de poros proteo-lipídicos. Los resultados sugieren que inicialmente HlyA forma el poro promoviendo la ruptura local de la estructura de la membrana, creando luego un poro con un superficie formada parcial o totalmente por las cabezas hidrofílicas de los lípidos (Bakás et al., 2006).

En cuanto al número de monómeros que forman estas estructuras, también existe gran controversia en los resultados publicados ((Menestrina, 1988) (Benz et al., 1989), (Ostolaza et al., 1993), (Ludwig et al., 1993), (Moayeri and Welch, 1994)).

Por último, apoptosis y necrosis son dos formas de muerte celular con características bioquímicas y morfológicas bien distintivas. La exposición de toxinas RTX a cultivos celulares han mostrado ambos tipos de muerte celular, dependiendo de la concentración de toxina empleada. A bajas concentraciones la vía seguida es la de apoptosis, mientras que a altas concentraciones se produce necrosis.

Por lo expuesto se puede observar que todavía hay muchas incertidumbres en el mecanismo de acción de HlyA, es por eso que es todo un reto tratar de dilucidarlo.

5. Objetivos

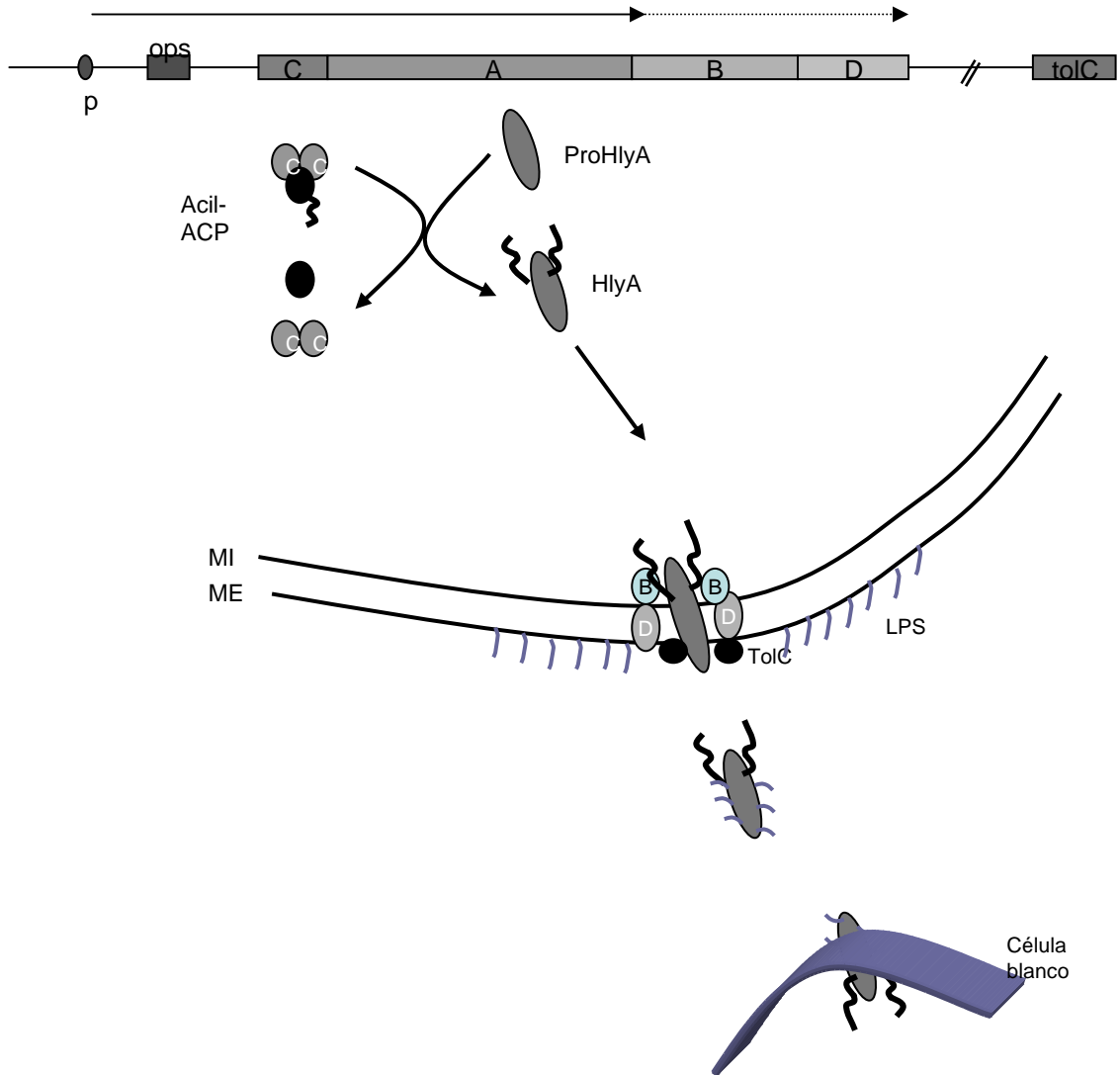
El objetivo de este trabajo de tesis es ampliar el conocimiento sobre el mecanismo de acción de la toxina proteica HlyA de *Escherichia coli*.

Para lograr dicho objetivo se han planteado las siguientes preguntas:

- Cuando Hly se excreta al medio extracelular lo hace unido a lipopolisacárido (LPS). ¿Qué rol cumple el LPS en la estructura y función de la toxina?
- ¿Existe otra vía alternativa de liberación al medio extracelular de HlyA, aparte del ya estudiado aparato de excreción HlyB/D?
- ¿Cuál es la función de los ácidos grasos unidos covalentemente a la toxina cuando ésta se encuentra en solución?
- ¿Cuál es la especie activa de la toxina cuando se inserta en la membrana? ¿Forma un oligómero? ¿Los ácidos grasos covalentemente unidos tienen participación en este proceso de oligomerización? ¿ existe participación de los rafts en este proceso?.



Capítulo II



Materiales y Métodos generales

Capítulo II: Materiales y Métodos generales

1. Purificación de HlyA y ProHlyA

Las proteínas fueron purificadas a partir de cepas superproductoras de *E.coli* WAM 1824 (pSF4000 en cepas JM15) para HlyA (Moayeri and Welch, 1997) o WAM 783 (*E.coli* DH1 transformada con el plásmido pSF4000 Δ BamHI, donde una porción del gen de *hlyC* fue eliminada) para ProHlyA (Boehm et al., 1990). Ambas cepas fueron gentilmente cedidas por el Dr. Welch (Universidad de Madison, Wisconsin).

Se crecieron las bacterias en medio Luria-Bertani (LB) sólido (NaCl 10 g/l, extracto de levadura 5g/l, triptona 10g/l, cloranfenicol 20 ug/ml y agar 20 g/l) (Maniatis et al., 1989) durante toda la noche a 37°C. Las bacterias fueron repicadas a LB líquido conteniendo 20 ug/ml de cloranfenicol, donde crecieron con agitación continua a 37 °C hasta fase logarítmica caracterizada por una DO_{600 nm} = 0.9-1. Se separaron las bacterias por centrifugación a 10000 rpm (centrífuga Sorvall, rotor SSA 34) durante 15 min a 4 °C. La proteína se precipitó a pH= 4.5 (pI de la proteína) con 20% de etanol frío. Luego de dos días el precipitado de la proteína se colectó por centrifugación a 10000 rpm durante 1 h, se resuspendió en buffer TCU (tris-HCl 20 mM, NaCl 150mM y urea 6M, pH= 7.4) y se almacenó a -20 °C.

Utilizando este método de purificación, la cantidad de ProHlyA obtenida fue baja. Por esta razón se purificó esta proteína a partir de cuerpos de inclusión, siguiendo el protocolo descrito por Sánchez-Magraner *et al* (Sanchez-Magraner et al., 2006). Brevemente, la técnica consiste en resuspender el *pellet* de bacterias en buffer TES (EDTA 10 mM, sacarosa 10 % p/v, tris-HCl 50 mM, pH= 7) durante toda la noche a -20 °C. Luego las células se descongelaron a 37°C y se trataron con lisozima (0,5 mg/ml) y 0.1 mM de PMSF en buffer de lisis (DTT 1 mM, EDTA 0.1 mM, tritón-X 100 0.5% v/v, tris-HCl 50 mM, pH=7). Se dejó 45 minutos en hielo para que ocurriera la lisis y se sonicó la muestra durante 10 minutos con Sonicador Branson Sonifier 450. Luego se centrifugó la muestra a 11500 rpm durante 20 min. a 4°C. Los cuerpos de inclusión obtenidos en el *pellet* se resuspendieron en buffer TU (tris-HCl 50 mM, urea 6M, pH= 7) y se purificó la proteína por cromatografía de intercambio iónico con una columna de DEAE-Sepharose (Amersham-Pharmacia, Uppsala, Suecia) eluyendo la muestra con un gradiente 0-150 mM NaCl, con un flujo 1ml/min. ProHlyA eluyó a 35

mM NaCl. Finalmente la proteína se guardó en buffer tris-HCl 50 mM, NaCl 35 mM y urea 6M, pH= 7 a -20 °C.

En el caso de HlyA, luego de cada purificación se midió la actividad hemolítica y la concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Antes de realizar los ensayos las proteínas fueron dializadas contra buffer TC (tris-HCl 20 mM, NaCl 150mM, pH=7.4) para eliminar la urea.

2. Ensayos de actividad hemolítica

Los ensayos se realizaron con sangre estéril y desfibrinada de carnero, caballo y/o conejo (Britania). Previo a cada ensayo se estandarizó la sangre a utilizar; para esto se tomó una alícuota de sangre y se hicieron sucesivos lavados con una solución de NaCl 0.9 % hasta que el suero quedó libre de hemoglobina. Luego se buscó una concentración de eritrocitos tal que al agregar 12,5 ul de ésta a 1 ml de agua destilada, la absorbancia medida a 412 nm fuera de 0.6.

Los ensayos se realizaron en placas de hemólisis por dilución seriada de 100 ul de toxina con 100 ul de buffer de hemólisis (tris-HCl 20 mM, NaCl 150mM, CaCl₂ 10 mM pH= 7.4). Se añadieron 100 ul de sangre estandarizada en cada pocillo de manera que el volumen final de todos los pocillos fuera de 200 ul, por lo que la dilución en el pocillo n será 2ⁿ. Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 30 min y tras dejar sedimentar los eritrocitos intactos se midió la hemoglobina liberada en el sobrenadante a 412 nm. (Snyder and Zwadyk, 1969).

Una unidad hemolítica (UH) se define como la cantidad de proteína necesaria para lisar el 50% de los eritrocitos, en las condiciones antes mencionadas. Para determinar la actividad hemolítica de una muestra dada se buscó aquel pocillo en el que la lisis de eritrocitos fuese del 50% empleando la fórmula:

$$\% \text{ de lisis en el pocillo X} = \frac{A_X - A_0}{A_{100} - A_0} \times 100$$

Donde A_X = absorbancia de la muestra, A_0 = absorbancia por lisis espontánea (medida en el sobrenadante de los pocillos control, que no tienen toxina) y A_{100} = absorbancia medida con agua destilada (lisis total).

A partir de este tipo de medidas se calculó la actividad y la actividad específica de las muestras. Por ejemplo: si una muestra de toxina (100 ul) con una concentración 10 ug/ml presenta un 50% de hemólisis en el pocillo 12, su actividad es de 40960 UH/ml y por consiguiente su actividad específica es 4096 UH/ug.

3. Cuantificación de proteína: Método de Bradford

Este método se basa en la reactividad del colorante azul de Coomassie con los residuos aromáticos y sobre todo con los residuos básicos de las proteínas, produciendo un desplazamiento del máximo de absorción de 465 nm a 595 nm (Bradford, 1976). El reactivo de Bradford se preparó con 50 ml de etanol (95%), 100 ml de ácido fosfórico (85%) y 100 mg de azul de Coomassie brillante G-250 (Sigma) para un volumen final de 1l, filtrando las veces necesarias para eliminar los residuos sólidos no disueltos. En los ensayos se mezclaron 100 ul de muestra con 1ml de reactivo Bradford. Después de 15 min. se midió la absorbancia a 595 nm. La curva patrón se realizó con seroalbúmina bovina disuelta en buffer TCU para corregir el efecto de la urea.

4. Electroforesis en geles de poliacrilamida: SDS-PAGE

Las proteínas son moléculas que poseen carga que refleja su composición en aminoácidos cargados. En las técnicas electroforéticas, las proteínas se introducen en un campo eléctrico, en el que migrarán a una velocidad que dependerá de su carga neta, tamaño, forma y viscosidad del medio en el cual se mueve. Por lo tanto, establecidas las condiciones de pH y fuerza iónica, las distintas proteínas migrarán a una única posición dentro del campo eléctrico determinado. Si a la mezcla de proteína y al gel se le agrega SDS (dodecil sulfato de sodio, detergente) éste le conferirá a todas las proteínas carga neta negativa y en ese caso la separaciones dentro del campo eléctrico dependerá solamente del tamaño y no de su relación carga/masa. Este tipo de corridas se denominan electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

En la separación de proteínas por electroforesis, el soporte utilizado fue una matriz polimerizada de acrilamida, N,N'-metilen-bis acrilamida, tetrametilendiamina (TEMED) y persulfato de amonio. Este soporte combina el efecto tamiz molecular y movilidad eléctrica. El efecto tamiz aumenta en gran medida la resolución y puede graduarse fácilmente el tamaño de poro con la modificación de las cantidades de acrilamida y bis acrilamida.

El método utilizado fue el de Laemmli (Laemmli, 1970). Se trata de un sistema vertical discontinuo que consiste en dos geles contiguos pero distintos: el gel separador por debajo y el gel de siembra por encima. Ambos tienen diferente diámetro de poro, pH y fuerza iónica. Esta discontinuidad actúa concentrando grandes volúmenes de muestra en el gel de siembra, resultando en una mayor resolución final. Se utilizó un gel de siembra al 4% p/v de acrilamida (malla de poro no limitante). Los distintos geles separadores utilizados a lo largo del trabajo de tesis fueron de 0,75 mm de espesor de 10% , 17% y 12,5 % p/v de acrilamida. También se prepararon geles preparativos de 1,5 mm. de espesor. Las corridas electroforéticas se realizaron a voltaje constante (100 o 120 mV).

Se empleó una cuba electrofórica Mini Protean II, Bio Rad, con una fuente de poder Power 200-2.0, Bio Rad.

Las proteínas se tiñeron con tinción Coomassie Blue o en algunos casos se realizó la tinción de plata (Oakley et al., 1980).

5. Producción de anticuerpos policlonales antiHly

Se siguió el protocolo descrito en “Antibodies” (Harlow and Lane, 1988):

5.1. Preparación de la muestra para inyectar

Una vez cuantificada la muestra por Bradford, se realizó un SDS-PAGE 10% preparativo. Se corrió el gel a 100 mV y se lo tiñó con Coomassie Blue. Luego se cortó la banda correspondiente a la proteína (se comparó el peso molecular de la misma con un estándar de bajo peso molecular (Amersham-Pharmacia) y se la colocó en decolorante nuevamente para eliminar la mayor cantidad de Coomassie. Se lavó la banda del gel con varios cambios de agua deionizada (millie Q) y se la secó con un papel absorbente. Se colocó la banda en un homogenizador pequeño y se lo trituró hasta convertirlo en un líquido viscoso. Luego se agregó un volumen igual de PBS y se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente. Finalmente se agregó un volumen igual de Adjuvante de Freund ¹(Sigma) completo para la primera inmunización e incompleto para las siguientes.

¹ **Adjuvante de Freund:** es una emulsión preparada con aceites no metabolizables. Si la mezcla contiene *Mycobacterium.tuberculosis* se lo denomina adjuvante de Freund completo, y si no la contiene se lo denomina incompleto. Para evitar la mayoría de los efectos adversos que produce (como formación de granuloma) se aconseja hacer la primera inmunización con Freund completo y las siguientes con el incompleto.

5.2. Inyección de la muestra:

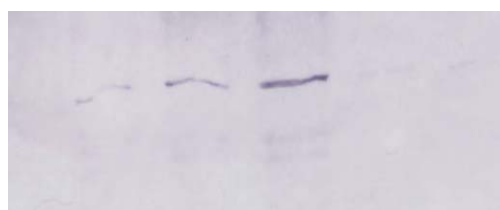
Se inyectaron subcutáneamente a dos conejos machos Neozelandeses con 0.5 mg de proteína cada uno. La segunda inmunización se realizó 20 días después de la primera con 0.25 mg de proteína. Dos semanas después se extrajo 1,5 ml de sangre de la oreja a cada conejo para testear la producción de anticuerpos. Se dejó coagular la sangre a temperatura ambiente, luego se centrifugó y se separó el suero. Para testear la producción de anticuerpos se realizó un Western Blot (se explicará mas adelante la técnica). El resultado fue el siguiente:

Dilución 1/500 de anticuerpo primario:



5ng 10 ng 20 ng

Dilución 1/1000 de anticuerpo primario:



5ng 10 ng 20 ng

6. Western Blot

Por la técnica de Western Blot se puede detectar una proteína en una mezcla de proteínas y también información del tamaño de ésta.

Proteínas lo suficientemente separadas en SDS-PAGE pueden ser transferidas a una membrana sólida de nitrocelulosa, aplicando una corriente eléctrica al gel (100 mV, 1h) de manera que se transfieran las proteínas a la membrana con el mismo patrón de separación logrado en el SDS-PAGE. Todos los sitios en la membrana que no contienen proteína transferida del gel tienen que ser bloqueados para que el primer anticuerpo no se fije de manera no específica, dando falsos positivos. El bloqueo se realizó con una solución 3% (m/v) de leche descremada disuelta en Tris-HCl 50 mM, NaCl 150mM, pH= 7.4 (TBS bloqueo), durante 2 hs con agitación suave continua.

Para detectar el antígeno transferido a la membrana se agregó el primer anticuerpo (antiHlyA) en la dilución adecuada (1/500) en TBS, durante toda la noche a 4°C con agitación suave y continua. Luego se realizaron 5 lavados de 15 minutos cada uno con buffer TBS para eliminar el exceso de anticuerpo. Para detectar los anticuerpos unidos se agregó un segundo anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina de conejo acoplado a una enzima (peroxidasa). Finalmente se realizaron nuevamente los lavados para eliminar el exceso de este segundo anticuerpo y se agregó un sustrato para

visualizar la banda donde el primer anticuerpo se unió a la proteína específica. La detección se realizó por un método inmunoquímico, que consiste en agregar peróxido de hidrógeno junto con un compuesto incoloro (4 Cl-1 naftol), sustrato de la peroxidasa acoplada al segundo anticuerpo, que formará un precipitado en la zona donde se encuentra la proteína de interés.

7. Preparación de sistemas modelo de membranas (liposomas)

Los **liposomas** son vesículas lipídicas compuestas principalmente por fosfolípidos organizados en bicapas, donde los grupos polares están en la superficie y las cadenas hidrofóbicas quedan secuestradas en el interior apolar. Las interacciones hidrofóbicas son las fuerzas que determinan esta formación. Estas vesículas contienen una fase acuosa interna y están suspendidas en una fase acuosa externa, pudiendo tratarse de la misma o distinta solución.

Para su preparación se resuspende la cantidad necesaria de lípidos (Avanti Polar Lipids) en cloroformo. Se evapora el solvente bajo una corriente de N₂ y luego se coloca 2 hs en bomba de vacío para evaporar los restos de cloroformo. Luego se agrega la solución acuosa con agitación energética para formar los liposomas. Estas partículas se denominan **vesículas multilamelares (MLV)**, porque están formadas por varias bicapas lipídicas concéntricas. Forzando a estas partículas a pasar a través de una membrana Nuclepore con un poro de tamaño determinado, en nuestro caso de 0.1 µm de diámetro utilizando el extrusor Avestin, se forman las **vesículas unilamelares grandes (LUV)**, formadas por una única bicapa lipídica. Esta técnica se denomina extrusión.

8. Métodos de fluorescencia

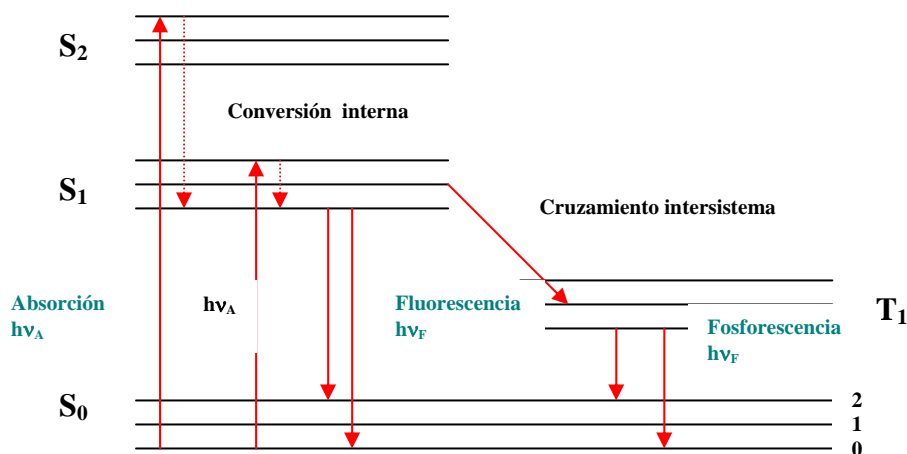
8.1. Fundamentos generales: (Lackowicz, 1984)

La luminiscencia es la emisión de fotones desde estados electrónicamente excitados. La luminiscencia se divide en dos tipos, dependiendo de la naturaleza de los estados basal y excitado. En un estado singlete, el electrón en el orbital de energía superior tiene la orientación del spin opuesta a la del segundo electrón en el orbital inferior. Se dice que estos dos electrones están apareados. En un estado triplete estos electrones están desapareados, o sea que sus espines tienen la misma orientación. El regreso al estado basal del electrón excitado desde un estado singlete no requiere que el

electrón cambie su orientación de spin. La fluorescencia es la emisión que resulta del regreso de un electrón al nivel basal de un electrón apareado. Estas transiciones están cuánticamente “permitidas” y las velocidades de emisión están en el orden de 10^8seg^{-1} . Estas altas velocidades de emisión resultan en vidas medias de fluorescencia de 10^{-8} seg, o 10 nseg. El tiempo de vida del estado excitado es el tiempo promedio en el que un fluoróforo permanece en el estado excitado. Las sustancias que desarrollan fluorescencia poseen electrones deslocalizados, formalmente presentes en dobles enlaces conjugados.

Los espectros de fluorescencia generalmente son presentados como espectros de emisión, o sea, la variación de la intensidad de fluorescencia en función de la longitud de onda. Estos espectros son dependientes de la estructura química del fluoróforo y del solvente en el que están disueltos.

Esquema de Jablonski:



La absorción y emisión de luz están ilustrados en el diagrama sugerido por A. Jablonski. Los estados basales, primero y segundo estados electrónicos son representados por S_0 , S_1 , y S_2 , respectivamente. En cada uno de estos niveles de energía electrónica, los fluoróforos pueden existir en un número de estados vibracionales, señalados como 0, 1, 2, etc.

La absorción ocurre en el orden de 10^{-15} seg, un tiempo demasiado corto para que se produzca un desplazamiento nuclear significativo. La relación de moléculas en los estados vibracionales 0 y 1 sigue una distribución de Boltzman:

$$R = e^{-\Delta E/kT}$$

Donde K =cte de Boltzman, ΔE es la diferencia de energía entre los dos estados y T es la temperatura en grados Kelvin. A temperatura ambiente $R = 0.01$, lo que significa que, al

estar la mayoría de las moléculas en su estado vibracional mas bajo, la absorción ocurre desde el nivel inferior.

Luego de la absorción de luz pueden ocurrir varios procesos. Un fluoróforo es generalmente excitado a algún nivel vibracional superior de S_1 o S_2 . Salvo excepciones, las moléculas rápidamente se relajan a los niveles vibracionales inferiores de S_1 . Este proceso se llama conversión interna y generalmente ocurre en 10^{-12} seg. Dado que los tiempos de vida del estado excitado son típicamente cercanos a 10^{-8} seg, la interconversión interna es completa previo a la emisión. Así, la emisión de fluorescencia generalmente ocurre de estados excitados, térmicamente equilibrados. Asimismo, la emisión también ocurre hasta un nivel vibracional excitado del S_0 , habiendo interconversión interna posterior.

8.1.1 Corrimientos de Stokes:

Excepto para átomos en fase vapor, invariablemente se observa un corrimiento de la emisión hacia longitudes de onda mayores, o sea con pérdida de energía. Este proceso puede tener varias causas. Una causa común de corrimiento de Stokes, es el rápido descenso a los niveles vibracionales más bajos de S_1 , más aún, los fluoróforos generalmente decaen a niveles vibracionales excitados de S_0 , resultando en pérdidas adicionales de energía vibracional; además de estos efectos, los fluoróforos pueden presentar corrimientos adicionales, debido a efectos del solvente y reacciones del estado excitado. Un ejemplo es el grado de exposición del triptófano al solvente (agua o bicapa)

8.1.2 Transferencia de energía:

En este proceso 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 el donador y aceptor. El grado de transferencia de energía (TE) depende de la extensión de solapamiento entre el espectro de emisión del donador y el espectro de absorción del aceptor, 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 estén separadas una distancia que no varíe durante la vida media del estado excitado del D.

La velocidad de TE desde un donador específico a un aceptor (k_t), esta dado por:

$$k_t = 1/\tau (R_0/r)^6$$

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 TE es del 50%. Esta dependencia con la distancia es útil para distancias críticas entre 20 y 50 Å, que son las distancias comparables al diámetro de la mayoría de las proteínas y el espesor de las membranas biológicas. En esta tesis se empleó para determinar la formación del oligómero, fusión de membranas y cálculo del área que ocupan las proteínas unidas en la membrana.

8.1.3 Scattering:

Muchas muestras biológicas presentan una turbidez significativa. Como consecuencia, la luz incidente puede ser dispersada e interferir produciendo falsos aumentos en la fluorescencia detectada. Por lo tanto, es importante trabajar en condiciones de mínimo scattering o de lo contrario, cuantificarlo mediante blancos apropiados para corregir las lecturas.

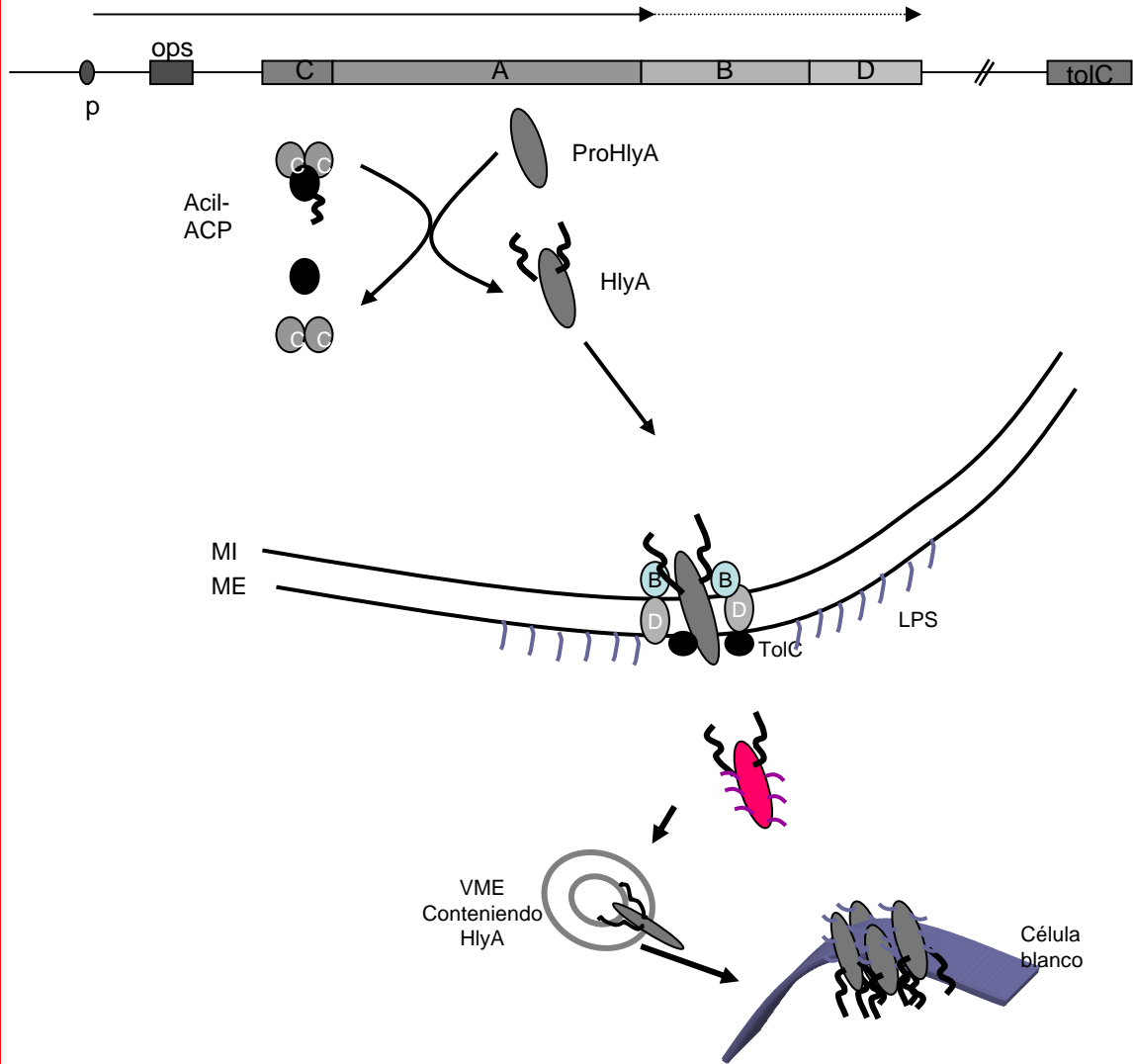
Un uso interesante que se le ha dado al scattering, surge del hecho de que la turbidez es dependiente de la concentración y del tamaño de las partículas presentes en la cubeta de medida. Por lo tanto, es útil analizar su valor en reacciones de asociación o interacción, en las cuales ocurra una modificación, como el efecto del LPS sobre el estado de agregación de la HlyA.

8.2. Fluorescencia de proteínas:

El uso de fluorescencia en proteínas ha sido exhaustivo y es el resultado de la presencia de fluoróforos naturales en la mayoría de ellas, como ser los aminoácidos Phe, Tyr y Trp. En general la fluorescencia de la Tyr y Phe es muy débil. El Trp es un muy buen fluoróforo, debido a su alta eficiencia de fluorescencia y además, a que el grupo indol es altamente sensible a la polaridad del solvente, estando sujeto a cambios generales y específicos. Como resultado de esto, el espectro de emisión de los residuos Trp puede reflejar la polaridad del entorno que lo rodea. Estos espectros son sensibles a la unión con sustratos y a reacciones de asociación y desnaturalización.

HlyA posee 4 Trp por molécula en las posiciones 431, 479, 578 y 913, de modo que el análisis de su emisión dió información muy valiosa en distintos ensayos de este trabajo. Debe recordarse que en todos los casos las mediciones son promedio de los cambios sufridos por todos los grupos, ya que no es fácil calcular la contribución de cada uno de ellos.

Capítulo III



Rol del LPS en la estructura y función de HlyA

Capítulo III: Rol del LPS en la estructura y función de HlyA

1. Introducción

Las bacterias Gram-negativas contienen una toxina termoestable denominada **endotoxina**. Este término caracteriza una clase de lipopolisacáridos (LPS) que son parte integral de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, y son responsables de su organización y estabilidad (Vaara and Nikaido, 1984). Como estructura superficial dominante, el LPS también participa en la interacción de la membrana bacteriana con el medio y posibles huéspedes. Aunque esta endotoxina está fuertemente unida a la membrana bacteriana, es continuamente liberada al medio.

En estudios previos sobre la caracterización química de muestras de HlyA purificada a partir de medio de cultivo, se encontró LPS no asociado covalentemente a la proteína (Ostolaza et al., 1991). Esta interacción se produciría durante el proceso de secreción de la misma al medio extracelular. Es por eso que en este capítulo se estudió que efecto puede producir el LPS en la estructura y función de HlyA.

El LPS es una molécula anfifílica cuya composición presenta variaciones intra e inter especie. En la Figura III.1 se representan esquemáticamente las regiones más importantes de esta molécula.

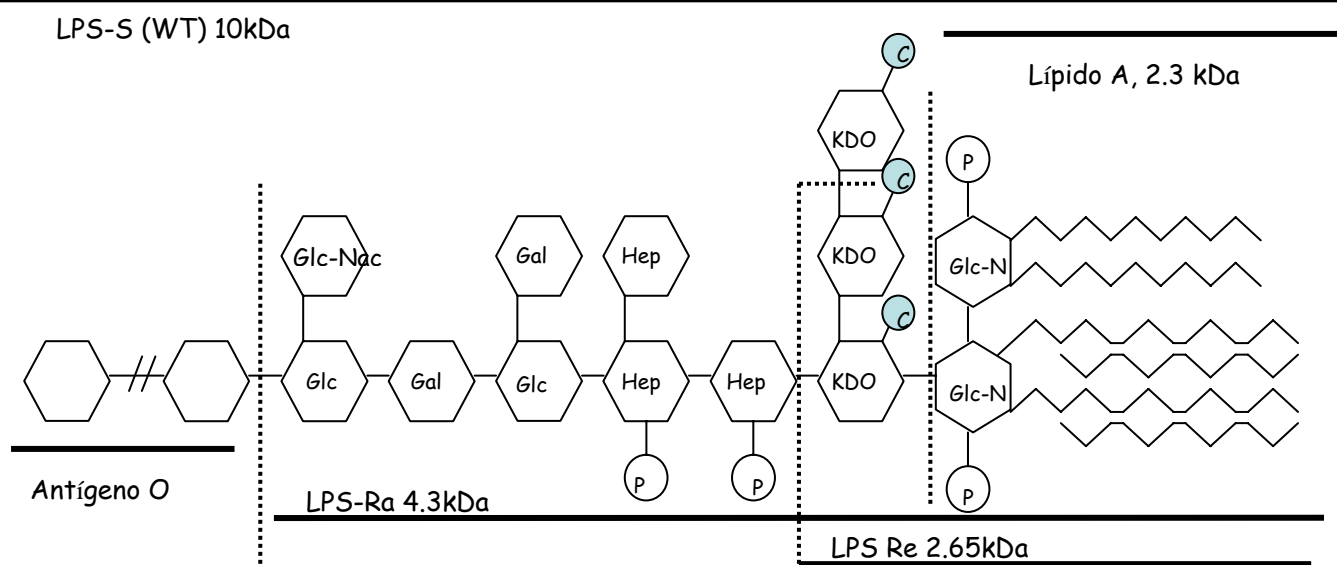


Fig III.1: Representación esquemática de la molécula de lipopolisacárido.

LPS: lipopolisacárido, LPS-S (WT): LPS liso (tipo salvaje) completo, LPS-Ra y Re: LPS rugoso (mutantes), Glc: Glucosa, Glc-Nac: N-acetil D- glucosamina, Gal: D-galactosa, Hep: 1-glicero-D-heptosa, Glc-N: D-glucosamina, P: fosfato, C: carboxilato.

El LPS está compuesto por el lípido A, que constituye la parte hidrofóbica de la molécula y a través del cuál se inserta en la membrana externa de la bacteria; un extremo distal constituido por un polisacárido lineal denominado antígeno O y uniendo ambas partes un hetero-oligosacárido no repetitivo conocido como *core* o núcleo.

El lípido A es la estructura biológicamente activa dentro de la molécula de LPS. Posee una estructura altamente conservada y es el responsable de la mayoría de las patologías severas asociadas a infecciones producidas por bacterias Gram negativas. En *Escherichia coli* el lípido A está formado por un disacárido de D-glucosamina con seis residuos de ácidos grasos y dos grupos fosfato. El número de sustituciones de ácidos grasos parece estar en relación directa con la capacidad de inducir respuesta inflamatoria, ya que moléculas de LPS con cinco cadenas acilo no inducen inflamación, pudiendo incluso actuar como antagonistas (Backhed et al., 2003).

El LPS y el lípido A, como moléculas anfifílicas forman agregados en medios acuosos por encima de su concentración micelar crítica (CMC). Por debajo de este valor las moléculas de LPS se presentan como monómeros mientras que por encima de la CMC, los monómeros están en equilibrio con las micelas. A mayores concentraciones de LPS los agregados anfifílicos forman agregados supramoleculares aproximadamente esféricos, los cuales pueden tener estructura multilamelar o no lamelar dependiendo de las condiciones fisicoquímicas del medio (Brandenburg et al., 2003) y de la forma de los monómeros (Brandenburg et al., 1993). A su vez, la estructura de los agregados del lípido A es determinante de su bioactividad (Schromm et al., 2000).

Monómeros \leftrightarrow Micelas \leftrightarrow Agregados Supramoleculares

Estudios previos sugieren una conexión entre HlyA y LPS. Las actividades hemolíticas y citotóxicas de la toxina son termolábiles, indicando que el LPS no es directamente el responsable de las diferentes actividades que ésta presenta. Algunos genes involucrados en la ruta biosintética del LPS, tal como *rfaC* afecta tanto la expresión como la actividad de HlyA (Bauer and Welch, 1997). El gen *rfaC* codifica para una heptosiltransferasa que agrega la primer heptosa del *core* interno al lípido A unido a KDO. Por lo tanto en cepas con esta mutación, el LPS consiste únicamente de lípido A y dos moléculas de KDO. HlyA purificada de cepas que contienen este gen mutado producen toxinas con menor actividad hemolítica, presentan un mayor

decaimiento de ésta actividad debido a la mayor tendencia a agregarse. La velocidad de secreción de la toxina no se ve afectada, por lo que estos datos sugieren que HlyA producida por estos mutantes se degrada mas rápidamente en el medio extracelular , por lo que el LPS puede proteger a la toxina secretada de la degradación. Por otro lado, HlyA producida por bacterias que contienen LPS-rugoso tienen la actividad lítica disminuída pero su expresión se mantiene intacta comparada con una cepa que contiene LPS-liso ((Bauer and Welch, 1997), (Standley et al., 1993), (Wandersman and Letouffe, 1993)). Otros estudios mostraron que las fracciones hemolíticamente activas purificadas por afinidad a partir de sobrenadantes de cultivos de cepas productoras de HlyA, reaccionan tanto con anticuerpos monoclonales anti-HlyA, como con anticuerpos anti-LPS, sugiriendo que las dos toxinas pueden existir en forma de complejo ((Bohach and Snyder, 1985), (Bohach and Snyder, 1986)). Pero ningún trabajo hasta ahora publicado ha estudiado los cambios conformacionales y funcionales como consecuencia de la asociación del LPS con HlyA.

En este capítulo se describe el rol del LPS en la estabilidad y función de la toxina. Para esto se estudiaron las modificaciones en la conformación de la proteína por fluorescencia de Trp, la estabilidad frente a la desnaturalización química y térmica, medidas de la reversibilidad de los agregados formados en solución y la actividad hemolítica de la HlyA por efecto del LPS.

2. *Materiales y Métodos*

2.1. Purificación de la toxina

A la fracción de proteína obtenida por el protocolo de purificación explicado en la sección de materiales y métodos generales, la denominaremos HlyA unida a LPS (**HlyA c/LPS**). Para obtener la proteína libre de LPS (**HlyA s/LPS**) se realizaron los siguientes pasos de purificación a partir de esta fracción:

Para separar el LPS unido a la toxina se realizó un SDS-PAGE 10 % preparativo, ya que en estas condiciones se separaron la proteína y el LPS. Luego se cortó la banda correspondiente a la proteína y se la extrajo del gel por electroelución (BioRad). Para eliminar el SDS se realizó una precipitación con KCl 0.25 M de las fracciones recolectadas de la electroelución, con la finalidad de renaturalizar la proteína (Sandri et al., 1993). Finalmente las muestras se dializaron contra buffer TC. De esta manera la toxina contenía cantidades despreciables de LPS determinadas químicamente por el contenido de KDO. La medida de la actividad hemolítica se realizó con la finalidad de asegurar el correcto plegamiento de la misma.

2.2. Cuantificación de KDO

Las concentraciones de KDO se determinaron por un microensayo colorimétrico (Karkhanis et al., 1978), donde 45 µl de muestra se mezclaron con 5 µl de H₂SO₄ 0.2N y se hirvieron durante 20 min en eppendorff. Pasado este tiempo, se centrifugaron las muestras a baja velocidad y a 4°C para recolectar todo el volumen en el fondo del tubo, y se agregaron 25 µl del reactivo de periodato preparado fresco (NaIO₄ 0.04 M (Sigma) en H₂SO₄ 0.125N). La mezcla se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 min y luego se agregaron 65 µl del reactivo de arsenito (NaAsO₂ 2% (Sigma) en HCl 0.5 N) con agitación continua. Las muestras se agitaron hasta que desapareció el color marrón de las mismas. Luego se agregaron 250 µl de ácido tiobarbitúrico 0.3% (Sigma Chemical Co.) con agitación continua y se las incubó en un baño de agua hirviendo durante 10 min, inmediatamente después se agregaron 125 µl de dimetilsulfóxido (Carlo Erba) a cada muestra mientras aún se encontraban calientes. Finalmente se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente y se midió la DO₅₅₀

nm. . Para realizar la curva patrón se utilizó KDO estándar (Sigma Chemical Co.) en un rango 0.1 a 2 µg.

2.3. Análisis por inmunobloting

Las muestras se resolvieron en un gel SDS-PAGE 10%. La dilución del anticuerpo policlonal anti-HlyA y del segundo anticuerpo fueron 1/1000. La detección se realizó por método inmunoquímico.

2.4. Electroforesis

Las muestras se corrieron en geles SDS-PAGE 10%. Las proteínas se tiñeron por Coomassie Blue y el LPS por una tinción con plata modificada (Fomsgaard et al., 1990).

2.5. Tinción del LPS: (Fomsgaard et al., 1990)

El gel SDS-PAGE 10% se tiñó con plata de la siguiente manera: el LPS se oxidó con una solución de ácido periódico (Sigma) 0.7% en 40% etanol- 5% ácido acético, durante 20 minutos a 22 °C. Luego se realizaron tres lavados de 5 min cada uno, con agua millie-Q. Se tiñó el gel con una solución de plata preparada en el momento durante 10 min. Luego se lavó nuevamente tres veces con agua millie-Q durante 5 min cada vez. Finalmente, se revelaron las bandas en una solución reductora que contenía cada 200 ml de agua, 10 mg de ácido cítrico y 0.1 ml de formaldehído 37%. La reacción se detuvo con una solución 10% de ácido acético.

2.6. Purificación del LPS

Para aislar el LPS de *E.coli* WAM 1824 se utilizó la técnica modificada de Westphal and Jann (Westphal and Jann, 1965). Se resuspendió el *pellet* de bacterias (1g) en 10 ml de PBS, luego se agregó 10 ml de agua destilada saturada en fenol, se agitó en un vortex y se incubó durante 10 min a 60°C-70°C . Pasado este tiempo se colocó en hielo durante 10 min y luego se centrifugó a 7000 x g a 4 °C durante 20 min. El LPS aislado en la fase acuosa fue dializado varias veces contra agua destilada y luego se liofilizó y guardó

a -20°C .

2.7. Reconstitución del complejo LPS-HlyA

Se mezclaron 200 μg de LPS aislado de *E.coli* WAM 1824 y 10 μg de HlyA libre de LPS en buffer TC. Se incubaron a 4°C durante 4 hs en presencia de deoxicolato de sodio (DOC) 0.6 % y EDTA 0.1 mM. El LPS tiene la propiedad de autoagregarse produciendo grandes formas moleculares polidispersas que deben desagregarse con detergentes, siendo el más eficiente DOC 0.6% (Shauds and Chun, 1980). El EDTA se agrega para eliminar cationes divalentes de manera de aumentar la dispersión del LPS por repulsión de cargas. Luego el complejo fue dializado varias veces contra buffer TC.

2.8. Medida de espectros de emisión de los Trp

Se midió la fluorescencia emitida por las proteínas entre 320-400 nm, excitando a 295 nm con un *slit* de 8 nm tanto para la excitación como para la emisión. Para esto se agregó cantidad suficiente de proteína en buffer TC en una cubeta de 1 ml.

2.9. Desnaturalización térmica y química

La emisión de fluorescencia de los Trp fue utilizada para estudiar los procesos de desnaturalización química y térmica de Hly c/LPS y Hly s/LPS.

La fluorescencia se midió después de incubar las muestras (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 10 minutos a cada temperatura desde 20°C a 85°C para estudiar la estabilidad térmica. Para estudiar la estabilidad química se midió la fluorescencia después de incubar las proteínas (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 2 hs a distintas concentraciones de cloruro de guanidinio, desde 0 a 5 M en buffer tris-HCl 20 mM, pH= 7 a 25°C .

Se midieron los espectros de cada muestra como se describió anteriormente y la relación de fluorescencia a 350 nm y 330 nm se utilizó para cuantificar el grado de desnaturalización tanto térmica como química.

2.10. Determinación de la estabilidad de los agregados por medidas de dispersión de luz

Se determinó el efecto del Triton X-100 sobre los agregados de HlyA c/LPS y HlyA s/LPS midiendo la dispersión de luz. Para este ensayo se utilizó una mayor concentración de proteína (100 µg/ml), para favorecer la agregación de la misma. Se midió el efecto que produce el detergente sobre estos agregados ya formados, mediante medidas de dispersión de luz a 90° en el espectrofluorómetro empleando una longitud de onda de excitación como de emisión de 500 nm. Todas las medidas se hicieron a 24°C.

2.11. Medidas de actividad hemolítica en función de la concentración de Ca⁺²

Se midió la actividad hemolítica de HlyA c/LPS y HlyA s/LPS según se describió en la sección de materiales y métodos generales, con la variante que el buffer de hemólisis fue preparado con cantidades crecientes de calcio, desde 0-10 mM. Las muestras fueron previamente dializadas en buffer TC con 0.5 mM de EDTA, para eliminar todo el calcio que podrían contener las muestras.

3. Resultados y Discusión

3.1. Purificación de Hly s/LPS

La purificación de HlyA es dificultosa por su tendencia a formar agregados polidispersos, por lo tanto es posible que muchos de los resultados contradictorios publicados acerca de su mecanismo de acción se deban a los diferentes esquemas de purificación utilizados. Las muestras purificadas de HlyA contienen cantidades significativas de LPS que permanece asociado aún empleando técnicas cromatográficas en condiciones desnaturizantes. Li and Clinkenbeard (Li and Clinkenbeard, 1999) demostraron que el LPS puede ser eliminado casi en su totalidad de la leukotoxina de *Pasteurella haemolytica*, otra toxina RTX, por SDS-PAGE preparativa. Esta técnica consiste en una electroforesis y elusión simultánea de las proteínas.

Siguiendo un esquema similar de purificación para HlyA como se describe en materiales y métodos, se obtuvieron los siguientes resultados:

Fig. III.2A

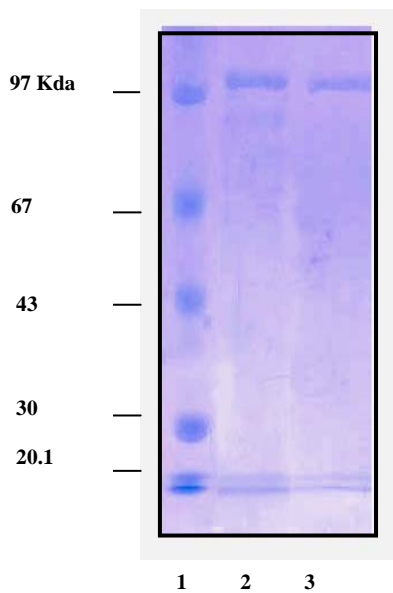


Fig. III.2B

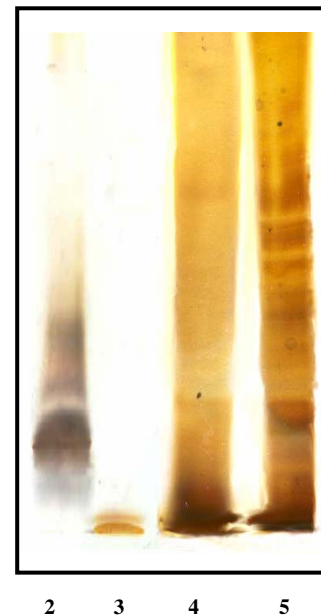


Fig. III.2C



Fig III.2: Análisis de las muestras HlyA c/LPS y HlyA s/LPS. Se realizó un SDS-PAGE 10% y se tiñó con: (A) Coomassie Blue para ver contenido de proteína, (B) tinción de plata para ver contenido de LPS, (C) Immunoblot utilizando antiHlyA. Calle 1: estándar de bajo peso molecular (Amersham), 2: HlyA c/LPS, 3: HlyA s/LPS, 4: LPS de *Salmonella abortus equi* (estandar), 5: LPS extraído de *E.coli* WAM 1824

En la Fig.III.2A se puede ver una banda principal de 110 kDa, peso molecular correspondiente a HlyA. El contenido de impurezas es aproximadamente del 10%, para la muestra HlyA c/LPS. Para comparar el contenido de LPS en ambas muestras se realizó una tinción de plata específica y se cuantificó el KDO. Como se ve en la Fig.III.2B el contenido de LPS en la muestra de HlyA s/LPS es despreciable con respecto al presente para la misma cantidad de HlyA c/LPS sembrada. Se sembró un LPS estándar, para demostrar la especificidad de la tinción y además compararlo con el LPS purificado de *E.coli* WAM 1824. Como el LPS de *Salmonella abortus equi* es LPS liso, por la similitud en el patrón de bandas se puede afirmar que el de *E.coli* WAM 1824 también es liso. Para confirmar la presencia de HlyA en ambas muestras se realizó un inmunoblot utilizando anticuerpos policlonales antiHlyA. En la Fig.III.2C se puede observar la presencia de HlyA en ambas muestras, descartando que la ausencia de banda en la Fig.III.2.B para la muestra Hlys/LPS se deba a la posible agregación de la proteína, impidiendo que ingrese al gel.

El contenido de LPS también se determinó químicamente por cuantificación de KDO, descrito en materiales y métodos. Los resultados se detallan a continuación en la tabla III.1.

Muestra	KDO ($\mu\text{g}/\text{mg prot}$)
Hly c/LPS	29.40 ± 2.95
Hly s/LPS	≤ 0.5

TablaIII.1: Contenido de KDO en HlyA c/LPS y HlyA s/LPS (n=3)

A partir de estos resultados podemos afirmar que la cantidad de LPS en la muestra que llamamos HlyA s/LPS es insignificante, por lo que es correcto utilizar estas muestras para los estudios comparativos con Hly c/LPS con el objeto de determinar el rol que tiene el LPS en la estructura y función de HlyA.

3.2. Espectros de emisión de los Trp

Para estudiar la interacción HlyA-LPS se hicieron medidas de fluorescencia del Trp, ya que HlyA contiene 4 Trp que actúan como fluoróforos intrínsecos y nos dan información acerca de su entorno.

Fig.III.3

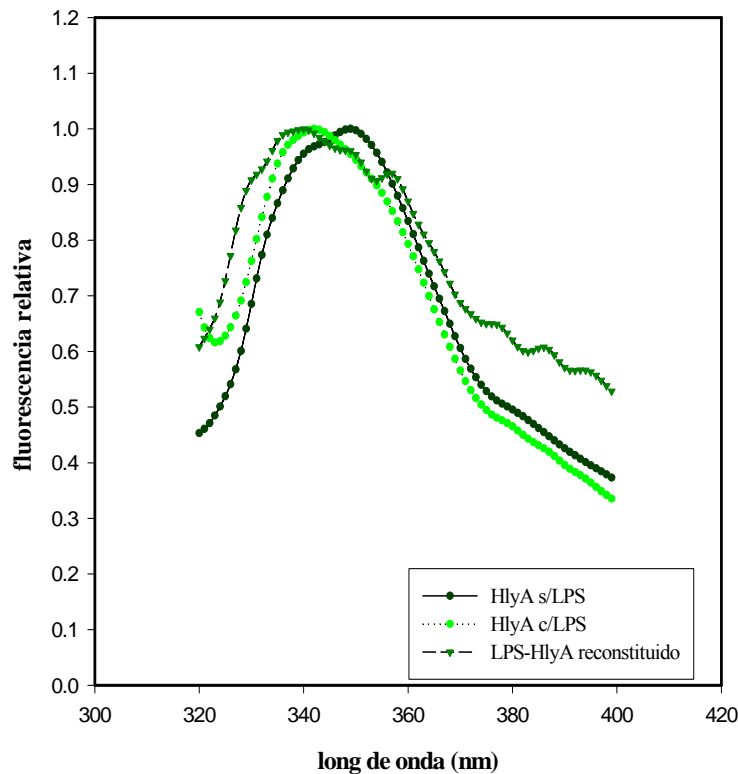


Fig.III.3: Medida de la fluorescencia intrínseca de HlyA s/LPS (●), HlyA c/LPS (●) y complejo HlyA-LPS reconstituido (▼), utilizando el LPS extraído de *E.coli* WAM 1824

En la Fig.III.3 se muestran los espectros de emisión de fluorescencia normalizado al valor correspondiente a su intensidad de fluorescencia máxima para las muestras, HlyA s/LPS y HlyA c/LPS. Se puede observar que la longitud de onda del máximo de emisión está desplazada hacia el azul para HlyA c/LPS, indicando que en promedio los Trp en esta proteína se encuentran en un entorno menos polar que en HlyA s/LPS. Para corroborar que ese efecto se debe a la presencia del LPS se midió el espectro al complejo HlyA-LPS reconstituido, preparado a partir de proteína electroeluida y LPS extraído de *E.coli*. Este complejo se preparó en presencia de DOC

0.6% y EDTA 0.1 mM, para promover la desagregación del LPS además de permitir a la proteína adoptar una conformación relajada en presencia de este desnaturizante suave, facilitando la interacción entre ambas moléculas. Se obtuvo un espectro para este complejo que se solapa exactamente con el espectro obtenido para HlyA c/LPS. La posibilidad de reconstituir este complejo nos da información para sugerir que la interacción HlyA-LPS no es al azar.

3.3. Estabilidad térmica y química de Hly c/LPS y Hly s/LPS

Más información acerca de cambios estructurales ocurridos en la proteína por la unión con LPS se obtuvieron a partir de estudios de estabilidad térmica y química. En general, la intensidad de fluorescencia de cualquier fluoróforo disminuye con el aumento de temperatura debido a las colisiones con el solvente. Como los residuos de Trp emiten a 350 nm en un entorno polar y a 330 nm en un entorno no polar, la relación de intensidades de fluorescencia (F350/F330) sirve para analizar la exposición de los triptófanos al solvente como consecuencia de la desnaturización.

Fig.III.4.A

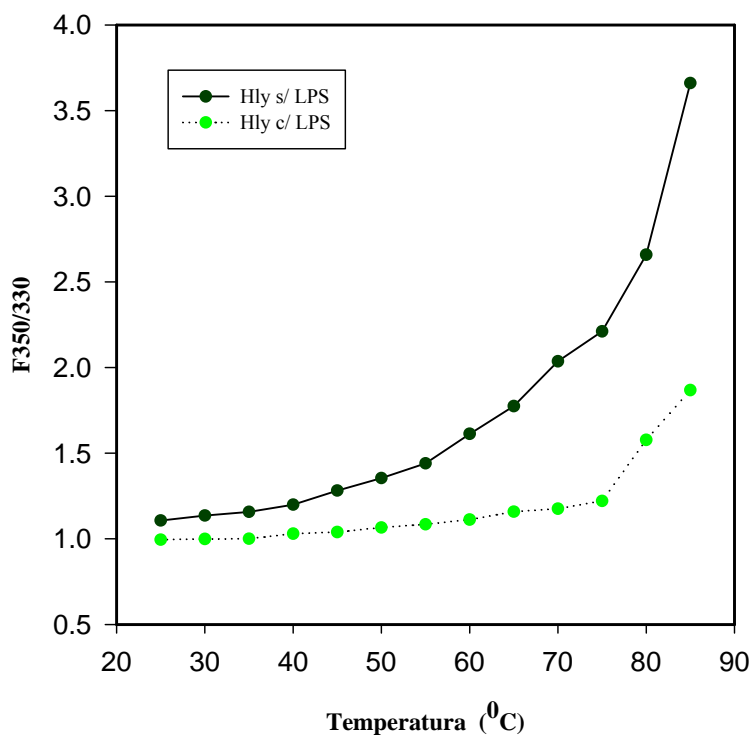


Fig. III.4A: Desnaturización térmica de HlyA s/LPS (●) y HlyA c/LPS (●) detectado por la relación F350/330 nm.

En la Fig.III.4A se observa que a temperaturas cercanas a 60 °C se detecta un abrupto aumento en la relación F350/F330 en ausencia de LPS, mientras que para HlyA c/LPS este aumento se produce a mayores temperaturas (70°C). Estos resultados muestran una clara diferencia en la estabilidad térmica de la proteína por interacción con el LPS.

Fig.III.4.B

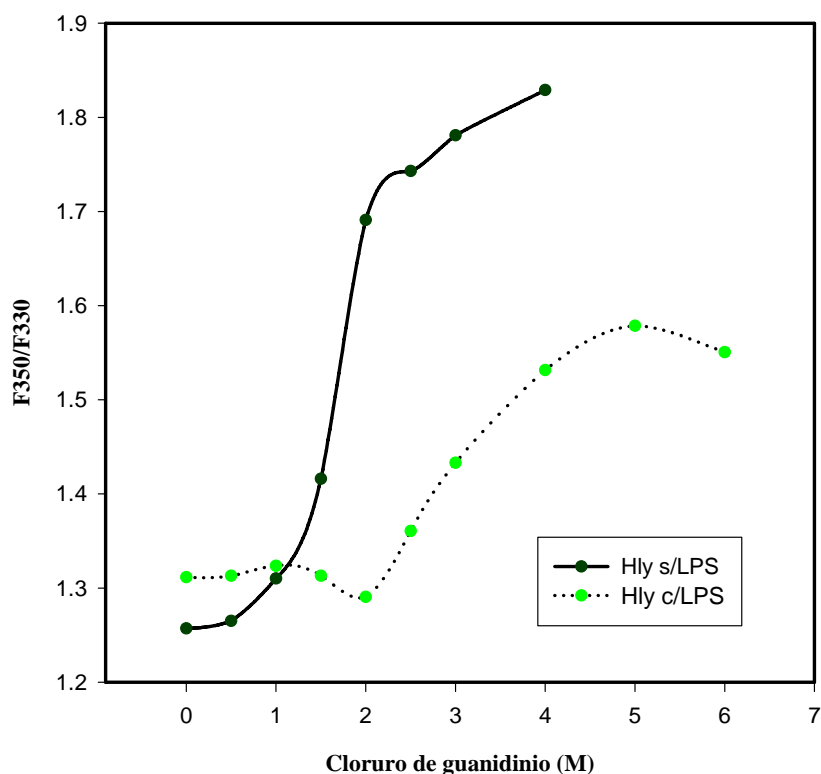


Fig.III.4B: Desnaturalización química de HlyA s/LPS (●) y HlyA c/LPS (●) detectado por la relación F350/330 nm.

En la Fig. III.4B se observa, que HlyA s/LPS se desnaturaliza a concentraciones de cloruro de guanidinio mas bajas (1.5 M aprox.) que HlyA c/LPS (3.5 M aprox). Además, aún en el estado desnaturalizado la asociación HlyA-LPS persiste, y esto se deduce a partir de los menores valores de la relación F350/F330 alcanzados en esta muestra.

3.4. Reversibilidad de los agregados por medidas de dispersión de luz

Existen evidencias previas acerca de la tendencia de HlyA a formar agregados en solución ((Ostolaza and Goñi, 1995), (Ostolaza et al., 1997), (Gonzalez Carrero et al., 1985)). Esto probablemente se deba a fuerzas hidrofóbicas entre los dominios que presenta esta proteína de naturaleza anfipática. Para evaluar el efecto producido por la presencia de LPS sobre la agregación, ambas muestras (HlyA s/LPS y HlyA c/LPS), se trataron con Tritón X-100, detergente que desagrega efectivamente agregados estabilizados por fuerzas hidrofóbicas. Los experimentos se realizaron a concentración de 0.1 mg/ml de proteína, ya que a esta concentración el equilibrio está desplazado hacia la formación de agregados.

Fig.III.5

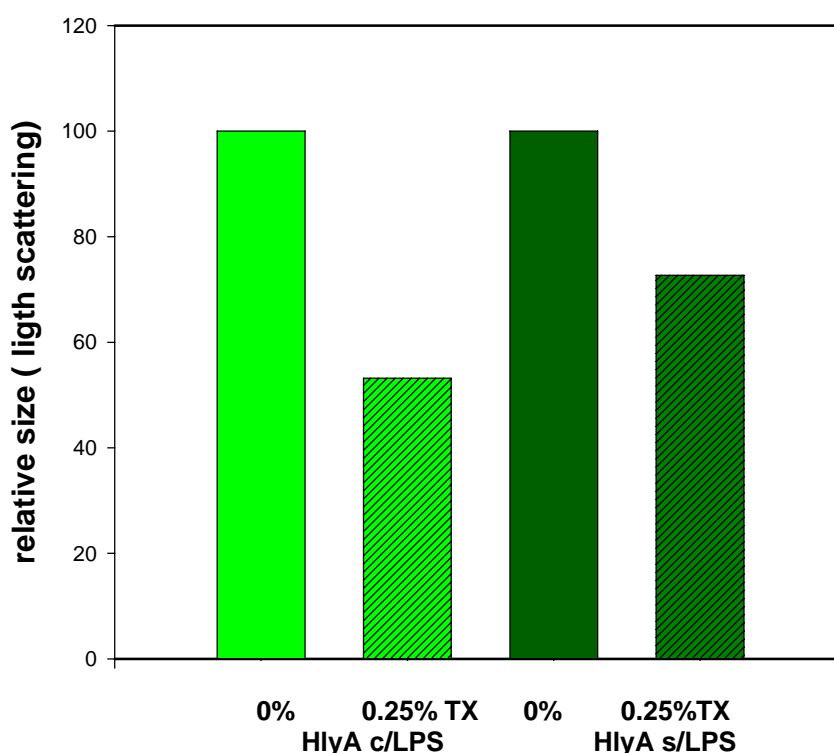


Fig. III.5: Medidas de dispersión de luz de HlyA s/LPS (■) y HlyA c/LPS (■) con detergente (rayado) y sin detergente (liso).

Se puede observar en la Fig.III.5, que la dispersión de luz disminuye aproximadamente un 25% con respecto al valor original para Hly s/LPS, mientras que para Hly c/LPS la disminución es del 50%. Esto nos indica que el LPS aumenta la

estabilidad de la proteína en solución, favoreciendo la reversibilidad de los agregados formados.

3.5. Medida de la actividad hemolítica en función de la concentración de Ca^{+2}

Para evaluar el efecto del LPS en la función de HlyA, se midió la actividad hemolítica a diferentes concentraciones de Ca^{+2} . Resultados previos demostraron que el Ca^{+2} es un catión esencial para la actividad de la toxina, la cual debe unir previamente este catión para poder interactuar con las membranas y así producir la lisis (Ostolaza et al., 1995).

Fig.III.6

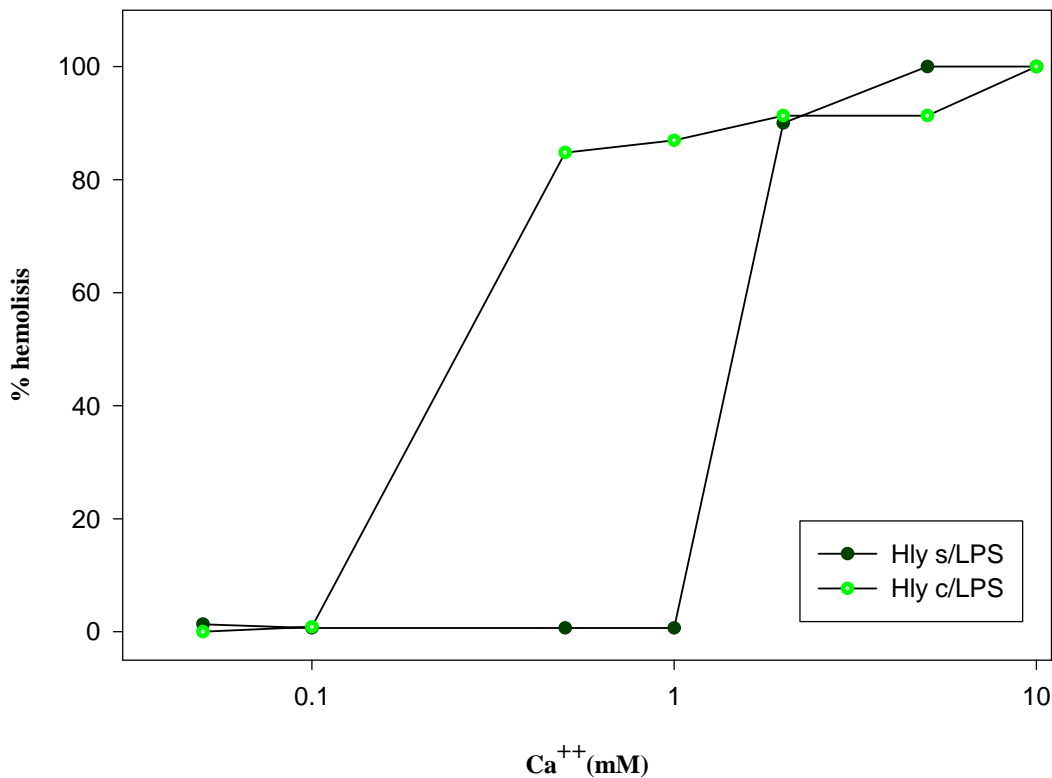


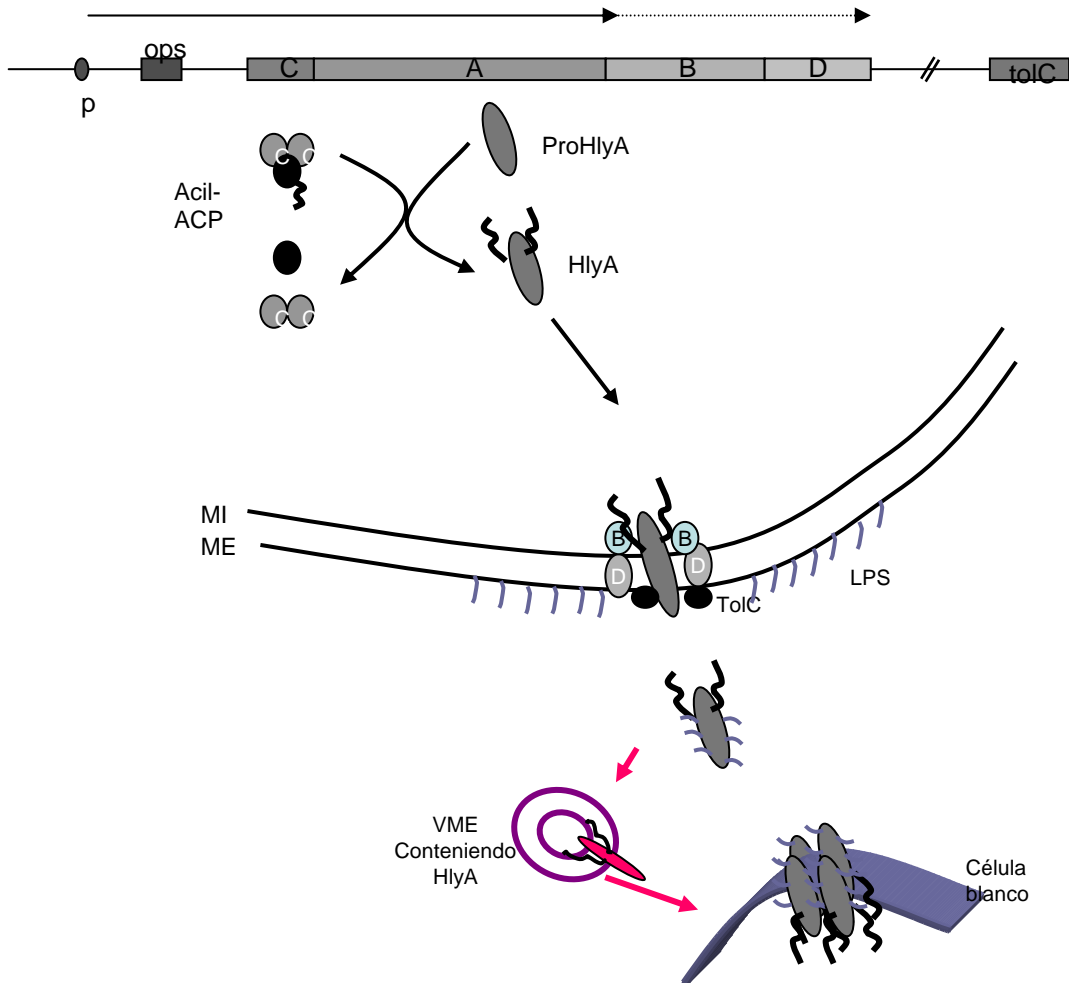
Fig.III.6: Actividad hemolítica en función de la concentración de calcio de HlyA s/LPS (●) y HlyA c/LPS (●)

Los resultados obtenidos en la Fig.III.6 muestran que el perfil de actividad de ambas muestras (HlyA c/LPS y HlyA s/LPS) son iguales, pero HlyA c/LPS alcanza mayor porcentaje de hemólisis a menor concentración de calcio, tomando en ambos

casos como 100% de hemolisis la DO_{412nm} del sobrenadante del pocillo que contenía 10 mM de calcio.

Estos resultados muestran que el LPS como componente del complejo LPS-HlyA, indirectamente afecta la actividad de la proteína, siendo su principal acción la de mantener la estabilidad de dicha proteína en solución. Es por esto que de ahora en mas los siguientes experimentos presentados en esta tesis se realizaron con la proteína que llamamos HlyA c/LPS, ya que es la mas estable y es la forma en que se secreta al medio y como se encontraría en el sitio de infección *in vivo*.

Capítulo IV



**Mecanismo alternativo
de
secreción de HlyA**

Capítulo IV: Mecanismo alternativo de secreción de HlyA

1. Introducción

La pared celular de las bacterias Gram-negativas posee una gran dinámica de recambio, característica que no posee la pared celular de las bacterias Gram-positivas. Vesículas de membrana externa (VME) son continuamente liberadas desde la superficie de las bacterias durante su crecimiento (Beveridge, 1999), las que están compuestas principalmente por: proteínas de membrana externa, lipopolisacárido (LPS), fosfolípidos y parte del periplasma. La liberación de las mismas puede ocurrir tanto si la bacteria es crecida en biofilms (Beveridge et al., 1997), como en medio sólido o líquido (Kadurugamuwa and Beveridge, 1997) o simplemente en su hábitat natural (Beveridge et al., 1997). La máxima velocidad de producción de estas vesículas ocurre hacia el final de la fase logarítmica. En la siguiente microscopía electrónica se puede observar la liberación de estas vesículas por una bacteria Gram-negativa no identificada (Fig IV.1).

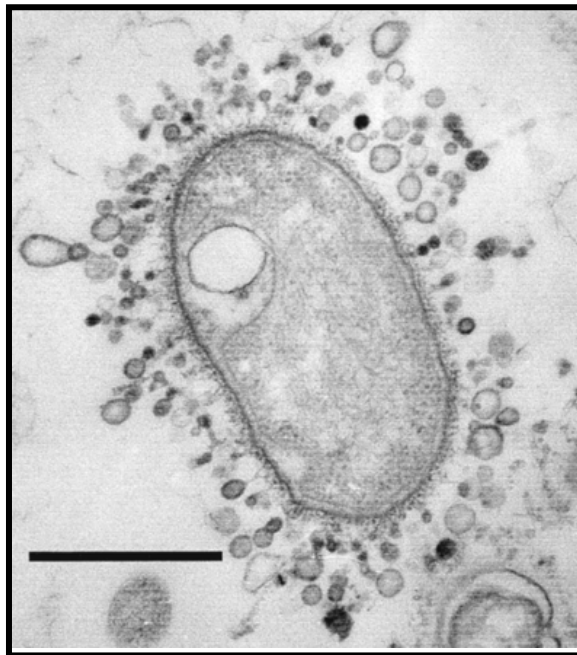


Fig IV.1: Foto extraída de “ Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles ”
Beveridge, T.J. (1999) *J. Bacteriol.* **181**:4725-4733

La patogenicidad de la mayoría de las bacterias Gram-negativas reside en la capacidad de las mismas para liberar factores de virulencia a los tejidos blanco, como

por ejemplo hemolisina, aerolisina, verotoxina, etc. Estos factores difunden hacia el tejido y lo destruyen. La libre difusión de dichas macromoléculas metabólicas puede ser inútil, ya que se diluyen por difusión y además ciertos constituyentes del huésped, como enzimas hidrolíticas, anticuerpos y otros componentes séricos, pueden inactivarlos. Por este motivo las VME pueden actuar como una vía alternativa de distribución de dichos factores. Además estas vesículas al ser pequeñas pueden localizarse en distintos tejidos y colonizar modulando la respuesta inmune por parte del huésped (Kuehn and Kesty, 2005). Por ejemplo, Fiocca *et al.* (Fiocca et al., 1999) observaron que vesículas liberadas por *Helicobacter pylori* se unen a células epiteliales *in vitro*, así como a la mucosa gástrica *in vivo*, sugiriendo que las vesículas pueden ser importantes para distribuir componentes bacterianos hacia el tejido gástrico del huésped. Recientemente, Kato *et al.* (Kato et al., 2002) observaron que VME secretadas por *Actinobacillus actinomycetemcomitans* están enriquecidas en leucotoxina, y sugieren que la formación de dichas vesículas es la causa del enriquecimiento de la leucotoxina.

Hasta el momento se han encontrado sólo dos toxina RTX asociadas a estas vesículas, hemolisina- adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* (Hozbor et al., 1999) y leucotoxina de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Kato et al., 2002). En este capítulo se estudió la liberación de HlyA por esta vía alternativa y se comparó el mecanismo de acción de la misma asociada a estas vesículas con el mecanismo que presenta la toxina en su forma libre.

2. *Materiales y Métodos*

2.1. Aislamiento de las VME

Estas vesículas se aislaron a partir de sobrenadante de cultivos de *E.coli* WAM 1824 y WAM 783, cepas superproductoras de HlyA y ProHlyA, respectivamente. Las bacterias se crecieron a 37°C en LB hasta fase exponencial tardía y se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 minutos para separarlas del medio. El sobrenadante resultante se centrifugó a 47500 rpm (centrífuga Beckman, rotor 70) a 4°C durante 2 hs, y se colectaron las vesículas en el *pellet*, el cual se resuspendió en buffer TC.

2.2. Purificación de HlyA libre

En este caso HlyA libre fue purificada a partir del sobrenadante resultante de la separación de las vesículas. La proteína se purificó por precipitación con 20% de etanol frío, durante 24 hs. El precipitado conteniendo HlyA se colectó por centrifugación a 10000 rpm durante 1 h a 4°C y se resuspendió en buffer TC.

2.3. Microscopía electrónica- Tinción negativa

Las VME fueron previamente fijadas tratando al sobrenadante libre de bacterias con 1% (v/v) de glutaraldehído durante 45 min. a temperatura ambiente. Luego se colectaron las vesículas por centrifugación a 47500 rpm durante 2 hs. a 4°C y se suspendieron en buffer 0.1 M acetato de amonio (pH= 7). La tinción negativa para la observación en microscopio electrónico, se realizó colocando una gota de la suspensión de vesículas sobre la grilla cubierta con un film de carbono. Después de 30 segundos el fluido en exceso se absorbió utilizando papel de filtro, y las muestras fueron teñidas con 2% (p/v) de ácido fosfotúngstico (pH 5,2 con KOH). La observación se realizó 50000 X.

2.4. Composición de las vesículas

2.4.1 Análisis de los lípidos

Los lípidos fueron analizados por cromatografía en capa fina. Previamente

los lípidos de las VME y LPS fueron extraídos siguiendo el protocolo de extracción de Folch *et al* (Folch et al., 1957). La cromatografía se realizó sobre placa de 20 cm X 10 cm de sílica gel HPTLC, y se realizaron 4 desarrollos sobre la misma placa de acuerdo a Perez, M *et al* (Perez et al., 1994), empleando como sistema de solvente: cloroformo- metanol- 2 propanol- 0.25% KCl- etilacetato (30 + 9 + 25+ 6+ 18).

Junto a las muestras de vesículas se sembró fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) y lipopolisacárido extraído de *E.coli* (LPS) como estándares. El LPS se extrajo de *E.coli* según se describe en materiales y métodos del capítulo III.

2.4.2 Análisis de proteínas y LPS

El análisis de proteínas y LPS se realizó por SDS-PAGE 10% y 17% para proteínas y LPS respectivamente. Las proteínas fueron visualizados por tinción de Coomassie y plata, mientras que para el LPS se realizó una tinción de plata específica para LPS (BioRad Kit). Para caracterizar las bandas correspondientes a HlyA y ProHlyA se realizó un Western Blot como se describe en materiales y métodos generales. El porcentaje relativo de HlyA en las vesículas se calculó a partir de la intensidad de las bandas presentes en el gel, empleando Kodac digital Science ID Software.

2.5. Ensayos de actividad hemolítica

Para estos ensayos se utilizaron las siguientes muestras: VME-HlyA (vesículas de membrana conteniendo HlyA), VME-ProHlyA (vesículas de membrana conteniendo HlyA) y HlyA libre, las que fueron diluídas y tratadas como se describe en materiales y métodos generales. En este caso se utilizó sangre de conejo y caballo (Britania).

2.6. Cinética de hemólisis

La cinética de hemólisis se estudió por descenso de la turbidez a 650 nm en función del tiempo a 37°C de una suspensión de eritrocitos de caballo estandarizado, la cual fue expuesta a VME-HlyA y HlyA libre. Los ensayos se realizaron agregando la cantidad de toxina correspondiente a 500 µl de eritrocitos de caballo estandarizado

diluidos en 500 µl de buffer de hemólisis. Se tomó como tiempo cero de hemólisis el momento en el cual se agregó la toxina a la mezcla anterior.

2.7. Ensayos de fusión

Para el análisis del mecanismo de acción de HlyA asociada a las VME, se realizaron estudios de fusión por transferencia de energía. Se analizó la fusión entre VME y liposomas marcados con N-(7 nitro 2,1,3 benzoxadiazol-4 il fosfatidiletanolamina (NBD-PE) y rodamina fosfatidiletanolamina (Rh-PE) (Molecular Probes). Ambos fluoróforos están unidos al grupo amino libre de fosfatidiletanolamina, por lo tanto pueden incorporarse como cualquier fosfolípido a la bicapa. Cuando ambos fluoróforos están presentes en una relación molar 0.6:0.6:100, se observa una eficiencia de 100% de transferencia de energía (TE). Después del mezclado de lípidos como consecuencia de la fusión de membranas, se observa una disminución de esta eficiencia (Struck et al., 1981). El 100% de mezclado de lípidos corresponde a las condiciones de dilución de 5 veces de los fluoróforos. Con el propósito de comparar los ensayos de VME-HlyA y HlyA libre se agregó la cantidad de muestra correspondiente a la misma actividad hemolítica. Los ensayos de transferencia de energía se realizaron excitando las muestras a una longitud de onda de 465 nm correspondiente al donador y se siguió su emisión en el tiempo a 530 nm.

Para calcular el porcentaje de mezclado lipídico de cada muestra, se agregó 0.2% de Tritón X-100 para tomar el valor de fluorescencia correspondiente al 100 % de fusión de cada ensayo. Por lo tanto el porcentaje de mezclado lipídico se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ mezclado lipídico} = (F_x - F_o / F_t - F_o) \times 100$$

donde F_x = fluorescencia medida después del agregado de LUV sin marcar en presencia de HlyA libre, VME y HlyA libre solamente; F_o = fluorescencia inicial y F_t = fluorescencia medida después del agregado de Tritón.



3. Resultados y Discusión

3.1. Aislamiento de las vesículas

Las VME fueron aisladas del sobrenadante del cultivo de cepas superproductoras de *E.coli* WAM 1824. Analizadas por microscopía electrónica, se observaron vesículas esféricas de diámetro entre 50-200 nm formadas por una bicapa .

Fig.IV.2

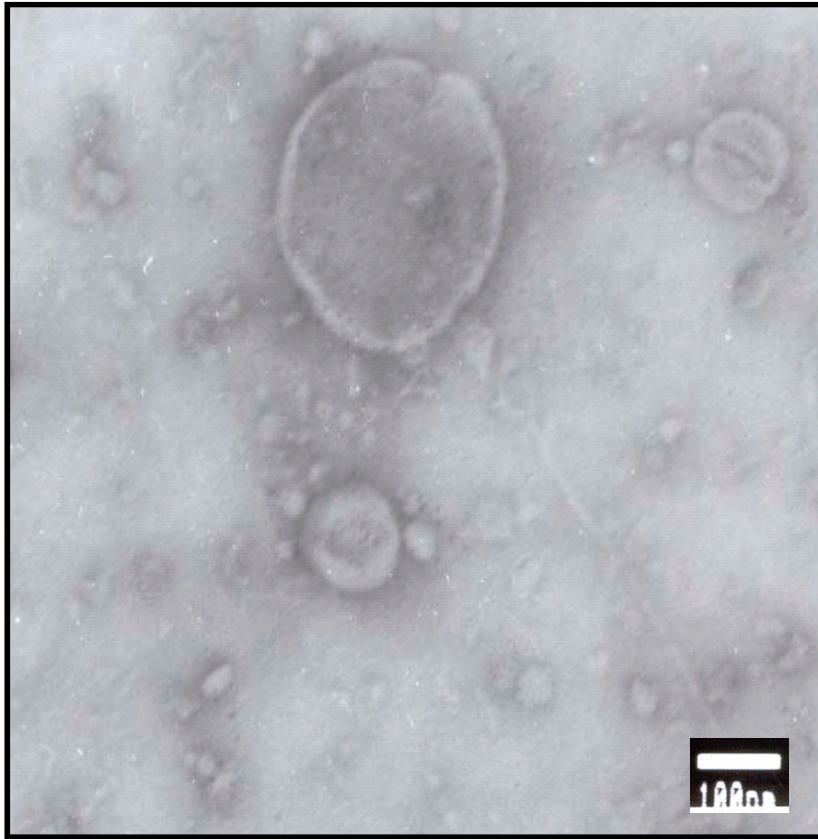
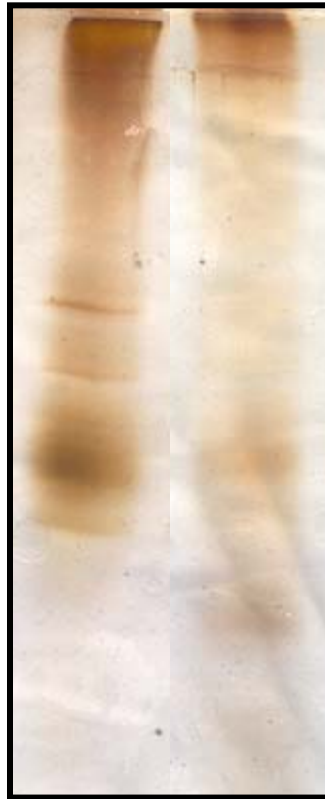


Fig IV.2: Fotografía de la observación por microscopio electrónico de la tinción negativa de las vesículas obtenidas a partir del cultivo de *E.coli* WAM 1824.

3.2. Análisis del LPS de las vesículas

Para confirmar que estas vesículas provienen de la membrana externa de la bacteria se determinó la presencia de LPS, componente exclusivo de la misma. Para esto se realizó un SDS-PAGE 17% teñido con plata (tinción específica para LPS).

Fig.IV.3



1

2

Fig IV.3: SDS-PAGE 17%, teñido para LPS.

1: LPS extraído de *E. Coli* WAM 1824 (5 ug)

2: VME de *E.coli* WAM 1824 (5ug)

Como se observa en la Fig.IV.3 las vesículas contienen LPS, sin embargo difieren en el patrón de bandas, a pesar de provenir de la misma bacteria. Como en este caso sólo se quiso utilizar el LPS extraído de la bacteria como control positivo de la tinción, no se profundizará en estudiar el origen de esta diferencia en la estructura. De todos modos esto no es sorprendente ya que se ha encontrado que las vesículas liberadas por *P. aeruginosa* difieren en la estructura del LPS, comparado con el de la bacteria que las genera (Kadurugamuwa and Beveridge, 1995).

3.3. Composición lipídica

Mediante cromatografía en placa fina, se analizó la composición lipídica de estas vesículas. Junto con la muestra se sembraron estándares de fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE), cardiolipina (CL), todos ellos fosfolípidos mayoritarios de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. También se sembró un extracto lipídico de LPS extraído de la bacteria como estándar.

Fig.IV.4

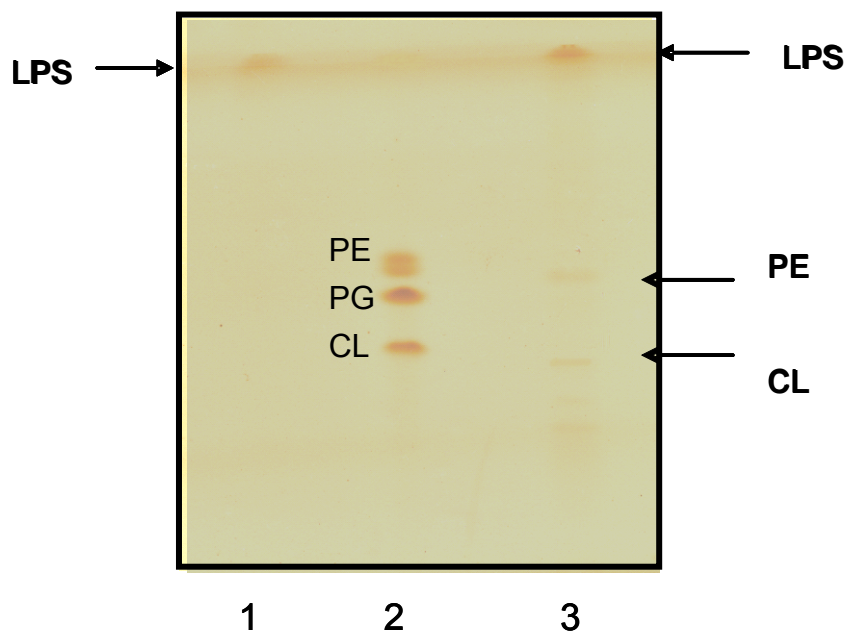


Fig IV.4: Cromatografía en placa fina de las VME.

1: LPS extraído de *E. Coli* WAM 1824, **2:** PE, PG y CL estándares, **3:** VME. Sistema de solvente:cloroformo-metanol-2,propanol-0.25% KCl-etilacetato (30+9+25+6+18)

Como se muestra en la Fig.IV.4 las vesículas están compuestas por PE y CL. La pequeña diferencia que se observa en las posiciones de las bandas entre los estándares y la muestra puede deberse a las distintas procedencias, ya que los estándares son de origen animal o vegetal (PE proviene de huevo y CL de soja) mientras que la muestra es bacteriana. Debido a esto, las especies moleculares de los fosfolípidos son distintas y además en bacterias son característicos los ácidos grasos ramificados. Los fosfolípidos encontrados son exclusivos de la membrana externa de la bacteria, otra característica que confirma la procedencia de estas vesículas. En la muestra también se puede observar una banda que corre igual que la fracción lipídica extraída del LPS.

3.4. Perfil proteico de las VME

Con el propósito de analizar el perfil proteico de estas vesículas se realizó un SDS-PAGE 10% el cual se tiño primero con Coomassie y luego con plata.

Fig.IV.5

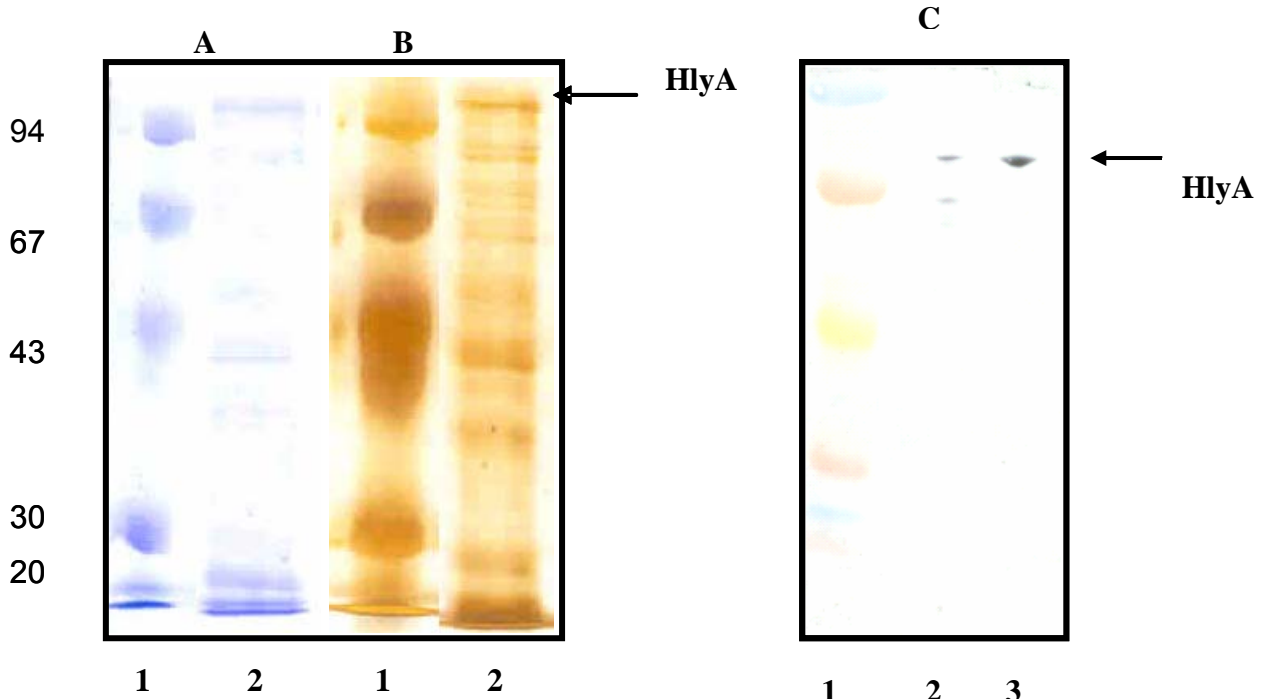


Fig IV.5: SDS-PAGE 10 % de las VME.

A: Tinción de Coomassie, **B:** Tinción de Plata, **C:** Western Blot, revelado con antiHlyA policlonal

1: estándar de peso molecular, **2:** VME, **3:** HlyA estándar.

En la Fig.IV.5 se observa el perfil proteico de estas vesículas. Puede observarse una banda (tinción de Coomassie) de un peso molecular aproximadamente 110 kDa, peso coincidente con el de HlyA. Para confirmar que se trata de HlyA se realizó un Western Blot de estas vesículas utilizando anticuerpos policlonales antiHlyA, y efectivamente esa banda de 110 kDa que aparece en el gel corresponde a la toxina. Por lo tanto podemos confirmar la presencia de HlyA en estas vesículas, correspondiendo a un 7-8 % de las proteínas totales de las vesículas.

3.5. Determinación de actividad hemolítica de VME y HlyA libre

Se determinó la actividad hemolítica de HlyA asociado a las vesículas y HlyA en forma libre, utilizando eritrocitos de caballo.

Tabla IV.1

	VME- HlyA	HlyA libre
Proteínas totales	2.7 mg/ml	1.53 mg/ml
HlyA	0.19 mg/ml	1.38 mg/ml
HU/ml (eritrocitos de caballo)	40960	2560
Actividad específica (HU/mmol)	$2.37 \cdot 10^{10}$	$2.04 \cdot 10^8$

Tabla IV.1: Medida de la actividad específica de HlyA libre y asociada a las VME .(n=3)

Como se observa en la tabla IV.1 HlyA secretada por estas vesículas es hemolíticamente activa, presentando una mayor actividad específica comparada con HlyA libre.

Para confirmar que la actividad hemolítica que presentan estas vesículas es característica exclusiva de la toxina y no de otras proteínas presentes en las vesículas, se purificó VME a partir de cepas productoras de la toxina inactiva ProHlyA, la cual es inactiva por carecer los ácidos grasos covalentemente unidos (Stanley et al., 1998). Se realizó un SDS-PAGE 10% para confirmar la presencia de ProHlyA en las vesículas y luego se midió la actividad hemolítica de las mismas.

Fig.IV.6

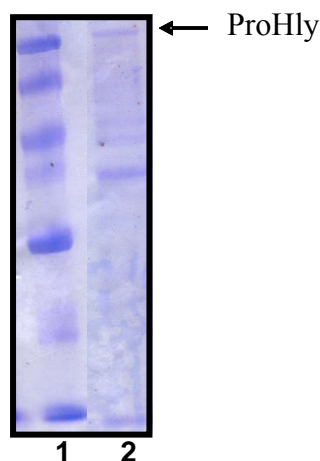


Fig IV.6: SDS-PAGE 19% de ProHlyA asociada a VME, teñido con Coomassie.
1: Estandar de peso molecular, **2:** ProhlyA asociada aVME

En el gel se observa la presencia de ProHlyA en estas vesículas. La actividad hemolítica de las mismas fue nula, por lo que podemos afirmar que la actividad hemolítica que presentan las vesículas es función exclusiva de HlyA presente en las mismas.

3.6. Comparación de la eficiencia hemolítica entre HlyA libre y VME-HlyA

El tipo celular clásicamente utilizado para estudiar el mecanismo de acción de HlyA es el eritrocito. En este caso se utilizaron eritrocitos de conejo y caballo por estar bien caracterizada la sensibilidad de hemólisis frente HlyA libre (Rennie and Arbuthnott, 1974).

Fig. IV.7

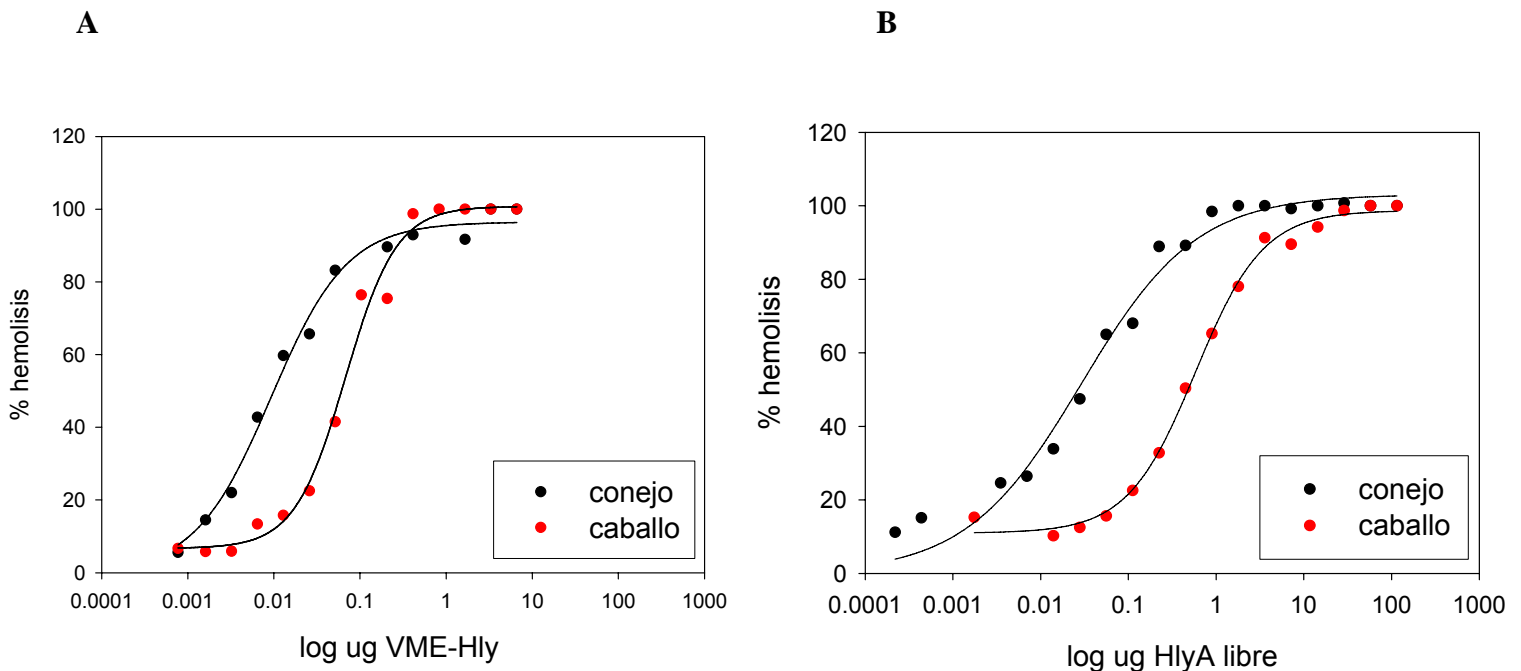


Fig IV.7: Medida de la actividad hemolítica de **A:** VME-HlyA , **B:** HlyA libre en (●) eritrocitos de conejo, (●) eritrocitos de caballo.

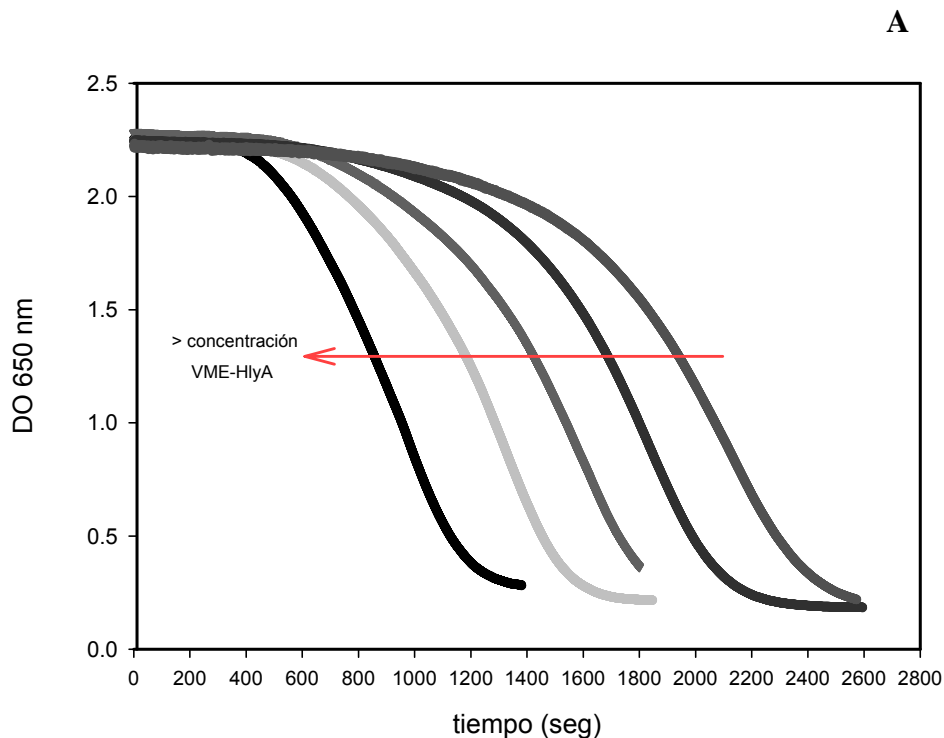
Como se observa en la Fig.IV.7 A y B los eritrocitos de ambas especies son mas susceptibles a HlyA asociada a VME que a HlyA libre, demostrando una mayor eficiencia lítica para la toxina asociada a las vesículas. Los eritrocitos de conejo son más sensibles a la hemólisis en ambos casos, como ya se había demostrado en trabajos

previos para la toxina libre (Rennie and Arbuthnott, 1974). Si bien ambas curvas mantienen la misma forma sigmoïdal; la pendiente es mas abrupta para la hemólisis utilizando eritrocitos de caballo. Esto sugiere la existencia de cooperativismo positivo en el proceso de hemólisis, probablemente debido a la presencia de receptores de alta afinidad (glicoforina) en estas células (Cortajarena et al., 2001); en cambio para los eritrocitos de conejo las curvas son mas suaves, dado que estos carecen de glicoforina (Ligi et al., 1988). La alta eficiencia lítica en este último caso puede deberse a la presencia de un gran número de receptores de baja afinidad como los fosfolípidos de la membrana.

3.7. Cinética de hemólisis de VME-HlyA y HlyA libre

En la Fig.IV.8 A y B se muestran las curvas de hemólisis en función del tiempo para VME-HlyA y HlyA libre.

Fig.IV.8



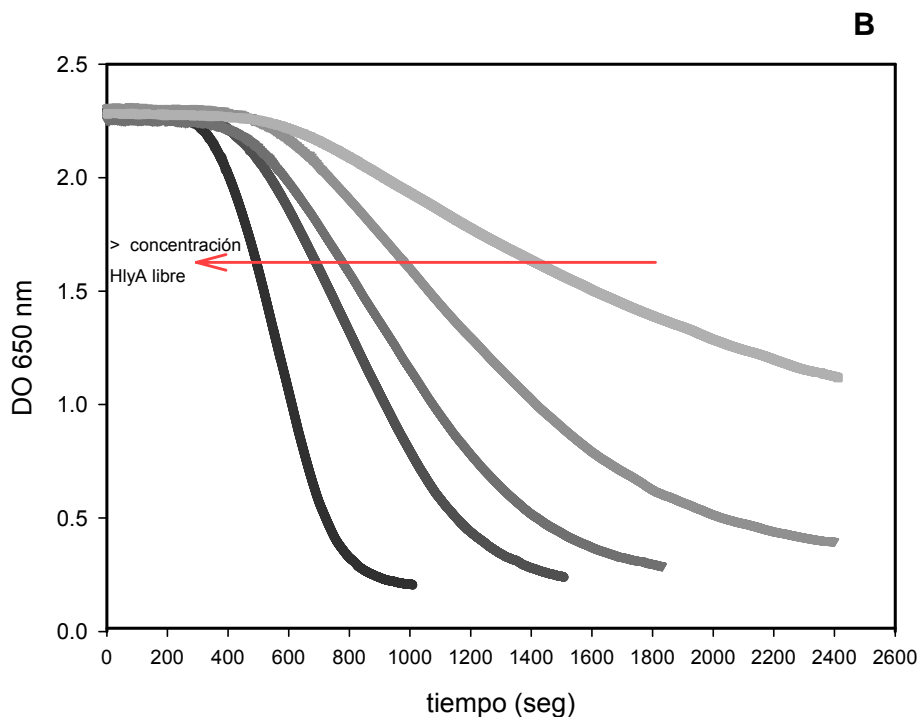
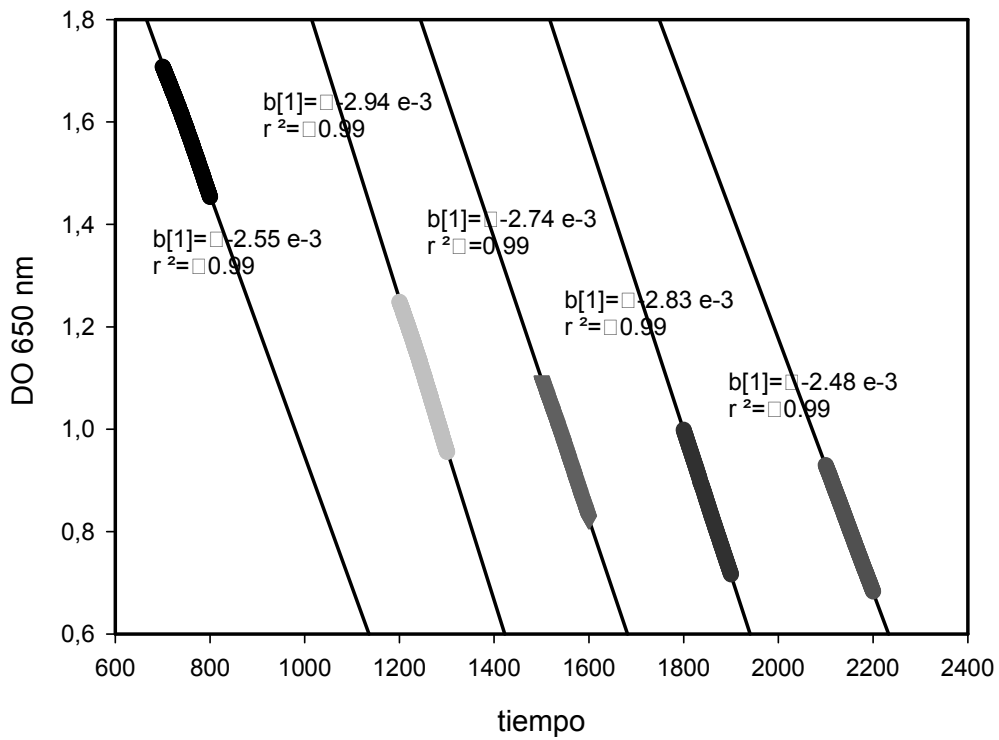


Fig IV.8: Cinética de hemólisis de distintas concentraciones de **A:** VME-HlyA , **B:** HlyA libre empleando glóbulos rojos de caballo

En las Fig.IV.8 A y B se observa un aumento en el tiempo necesario para alcanzar un 50% de hemólisis (tiempo medio de hemólisis), a medida que disminuye la concentración tanto de VME-HlyA como HlyA libre. Las curvas de hemólisis muestran un período lag bien definido para ambas muestras, sin embargo este período es mayor a medida que disminuye la cantidad de VME-HlyA y se mantiene constante con la concentración de HlyA libre. Esto indicaría que el paso limitante en el proceso hemolítico para VME-HlyA es la difusión de las partículas en el medio acuoso debido a su alto peso molecular comparado con HlyA libre.

De la porción lineal de las curvas anteriores se puede calcular la velocidad inicial de hemólisis en cada caso, como se muestra en la Fig.IV.9 A y B.

Fig.IV.9

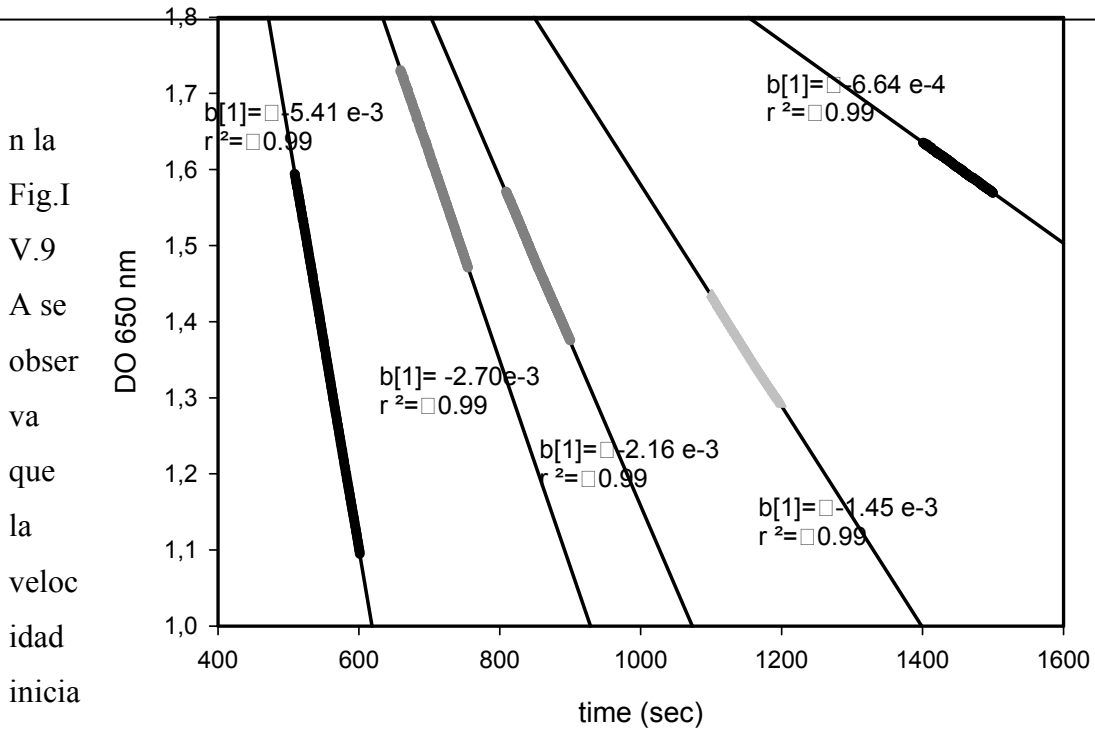


> concentración de VME-HlyA



A

Fig IV.9: Cálculo de las velocidades iniciales de hemólisis de distintas concentraciones de **A:** VME-HlyA , **B:** HlyA libre



> concentración de HlyA libre



B

n la
Fig.I
V.9
A se
obser
va
que
la
veloc
idad
inicia
l de

hemólisis se mantiene prácticamente constante para las diferentes concentraciones de VME-HlyA ensayadas, mientras que estas velocidades disminuyen con la disminución de la concentración de HlyA libre (Fig.IV.9 B).

A partir de las diferencias encontradas tanto en el tiempo lag, como en las velocidades iniciales para VME-HlyA y HlyA libre, se puede concluir que el paso limitante en el proceso de hemólisis para VME-HlyA es la difusión en el medio acuoso, originando una concentración local de la toxina próxima al eritrocito . Por otro lado, el paso limitante para HlyA libre es el número de toxinas que alcanzan el eritrocito para destruirlo, como lo demuestra el descenso de la velocidad inicial con la concentración de toxina.

3.8. Determinación del mecanismo de acción de HlyA asociada a VME

Para determinar si la fusión de membranas es el mecanismo de acción utilizado por HlyA asociado a VME, se realizaron ensayos de mezclado lipídico donde se midió la eficiencia de transferencia de energía (TE) entre VME y LUV de PC:PE:Chol (2:1:1) marcados con 0.6% mol de NBD-PE (donor) y Rh-PE (aceptor). Se eligió esta composición lipídica de LUV porque en estudios previos se encontró que estos son los mas sensibles a HlyA (Ostolaza, et al , 1993). La concentración de fosfolípidos de LUV utilizados en estos ensayos fue de 0.1 mM, cantidad de fosfolípidos equivalente a la presente en la suspensión de eritrocitos utilizados en los ensayos de hemólisis.

Un ejemplo de los espectros que se obtuvieron se muestra en la Fig.IV.10

Fig.IV.10

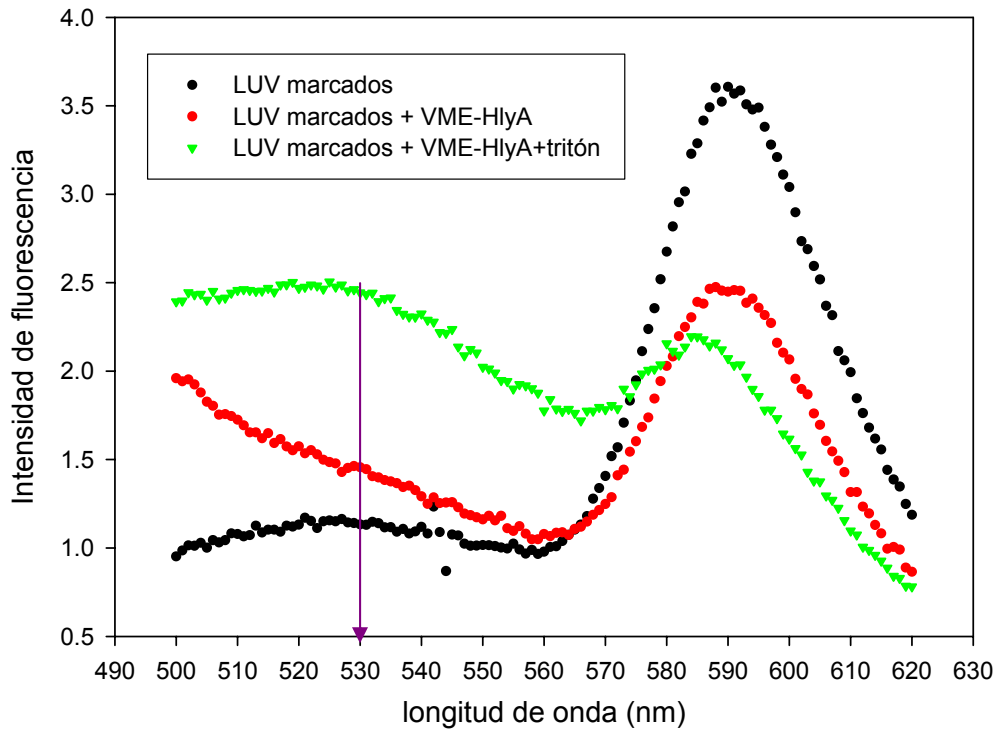


Fig IV.10: Ejemplo de los espectros obtenidos para el ensayo de fusión. A LUV marcados (●) se le agregó VME-HlyA (●) y finalmente se agregó Tritón para romper los LUV (●)

Para determinar si el proceso de mezclado lipídico era instantáneo o dependía del tiempo se midió la fluorescencia emitida por el donador a 530 nm en función del tiempo, y a partir de estos datos se calculó el porcentaje de mezclado lipídico como una disminución en la transferencia de energía entre los fluoróforos presentes en los liposomas como consecuencia del agregado de VME-HlyA (Fig.IV.11).

Fig.IV.11

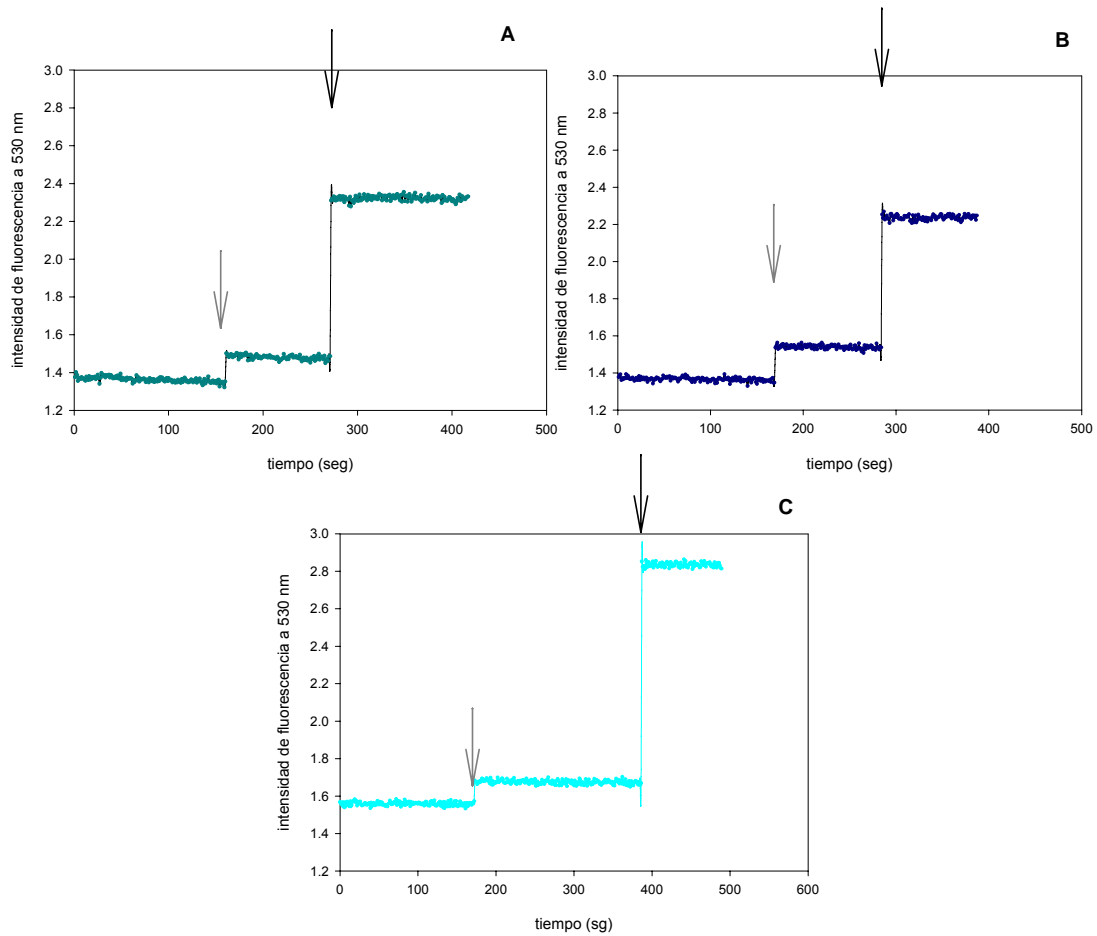


Fig IV.11: Ensayos de mezclado lipídico entre: LUV marcados y LUV sin marcar inducido por HlyA libre (A), LUV marcados y VME (B), LUV marcados en presencia de HlyA (C).
 ↓ Corresponde al agregado de LUV sin marcar en presencia de HlyA, VME y HlyA libre respectivamente.
 ↓ Corresponde al agregado de 0.2% Tritón X-100.
 La concentración de lípidos totales fue de 0.1 mM y 40 HU de HlyA libre y asociada a vesículas (VME-HlyA).

Tabla IV.3

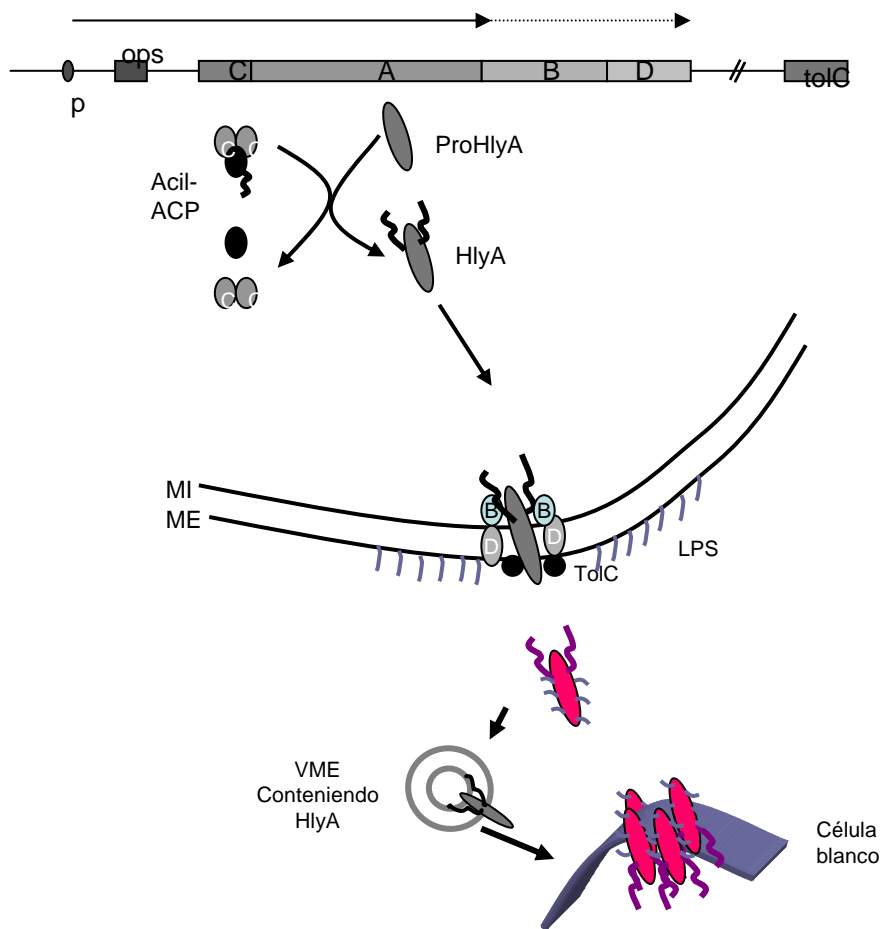
Muestra	Porcentaje de mezclado lipídico
A- LUV marcados + LUV sin marcar (1:4) en presencia HlyA libre	16.15 ± 3.65%
B- LUV marcados + VME	18.12 ± 0.32%
C- LUV marcados + HlyA libre	12.20 ± 1.2%

Tabla IV.2: Porcentaje de mezclado lipídico (n=3)

En un estudio previo se ha demostrado que HlyA libre no induce fusión de membranas (Ostolaza et al., 1993), por lo tanto la muestra A es el control negativo de fusión, sin embargo se observó un 16% de mezclado de lípidos. En la tabla IV.2 se puede observar que el valor obtenido para la muestra C, donde se agregó HlyA a LUV marcados, corresponde a la disminución de TE por inserción de la proteína, ya que en esta muestra no existe mezclado de lípidos. El porcentaje calculado para la muestra B y A son comparativos a los encontrados para la muestra C, por lo tanto los porcentajes calculados para ambas muestras también corresponde a la disminución de TE por inserción de la toxina. Esto nos permite deducir que la toxina asociada a las vesículas no produce hemólisis de los eritrocitos mediante un mecanismo de fusión, sino que ésta se transfiere desde las vesículas a los eritrocitos donde se inserta y como consecuencia se produce la lisis.

En conclusión, podemos confirmar la liberación de HlyA asociada a vesículas secretadas desde la membrana externa de la bacteria, constituyendo una vía alternativa de secreción. Si bien la toxina asociada a estas vesículas tiene la misma especificidad, su eficiencia lítica es mayor. Su mayor actividad específica se debe a que asociada a las vesículas el tiempo de difusión de la toxina en medio acuoso es mayor, comparada con HlyA libre, pero cuando alcanza al glóbulo rojo un gran número de moléculas de toxinas concentradas en las vesículas son transferidas, produciendo la lisis del mismo.

Capítulo V



**Rol de los ácidos grasos
en la estructura y función
de HlyA**

Capítulo V: Rol de los ácidos grasos en la estructura y función de HlyA

1. Introducción

Muchas toxinas proteicas de bacterias Gram-negativas para adquirir actividad biológica requieren de procesos de activación luego de la traducción. Este es el caso de HlyA que se sintetiza como un precursor no tóxico, **prohemolisina (ProHlyA)**, el cual se activa en el citoplasma por la adición de ácidos grasos, vía uniones amida, a dos residuos internos específicos: las lisinas K564 (KI) y K690 (KII). Las toxinas de la familia RTX son las únicas proteínas bacterianas que requieren de esta modificación post-traducciona para ser activas (Stanley et al., 1998). Esta activación está dirigida por la cosintetizada HlyC, una aciltransferasa que utiliza la proteína transportadora de acilo (ACP) como dadora de los ácidos grasos, mayoritariamente mirístico en el caso de la HlyA ((Hardie et al., 1991), (Issartel et al., 1991), (Hughes et al., 1992), (Standley et al., 1996), (Ludwig et al., 1996)).

Se sabe que la acilación de proteínas incrementa la hidrofobicidad de las mismas aumentando la asociación de muchas proteínas con membranas, mediando interacciones específicas proteína-proteína y/o lípido-proteína. También parecen ser importantes en la señalización intracelular de proteínas cuando éstas interaccionan con microdominios en la membrana de la célula blanco (Melkonian et al., 1999). Sin embargo, se sabe muy poco de los cambios estructurales que pueden inducir estos ácidos grasos covalentemente unidos a la proteína en solución.

A diferencia de otras proteínas que interaccionan con membranas, esta toxina ha mostrado tener actividad mediante la interacción directa con la bicapa lipídica de las membranas celulares. A pesar de que algunas células contienen receptores para HlyA, como la glicoforina, presente en eritrocitos de algunas especies (Cortajarena et al., 2001), liposomas compuestos por lípidos puros, constituyen también un buen modelo para el estudio de la actividad ((Bakás et al., 1996), (Ostolaza et al., 1997), (Soloaga et al., 1998)). El daño de la membrana es el resultado directo de la actividad de la toxina, por esta razón, constituye un ejemplo claro de proteínas de elevado peso molecular que pueden ser transferidas desde el medio acuoso a la matriz hidrofóbica de las membranas

celulares. La importancia del estado físico de la bicapa lipídica en la inserción de HlyA ha sido descrita en detalle (Bakás et al., 1996), sin embargo las fuerzas hidrofóbicas no son las únicas involucradas en la interacción de HlyA; las fuerzas polares y electrostáticas también juegan un rol en este proceso (Ostolaza et al., 1997). Se han descrito al menos dos fases en la interacción HlyA-membranas: una fase de adsorción reversible a la superficie y luego una fase de inserción irreversible a la membrana. La fase de adsorción reversible está gobernada por fuerzas electrostáticas y no necesariamente conduce a la lisis celular (Bakás et al., 1996), (Ostolaza et al., 1997). Para que esto último ocurra, la proteína debe unir calcio previo a la unión a membranas. El calcio induce un estado competente capaz de insertar irreversiblemente a la proteína en la membrana ((Ostolaza et al., 1995), (Bakás et al., 1998), (Schindel et al., 2001)). Además, HlyA se une a la bicapa lipídica con aproximadamente la misma afinidad en presencia y ausencia de calcio, pero solo el cambio conformacional que induce este catión hace que la lisis ocurra.

La influencia de la acilación de HlyA en la unión a membranas ha sido estudiada por diferentes grupos, pero los resultados encontrados han sido contradictorios. Algunos concluyeron que ProHlyA es incapaz de unirse a membranas de eritrocitos ((Boehm et al., 1990), (Ludwig et al., 1988)). Sin embargo, otros trabajos sugirieron que la acilación no aumenta la afinidad de la toxina ni por membranas artificiales, ni por membranas de células animales ((Bauer and Welch, 1996), (Moayeri and Welch, 1997), (Soloaga et al., 1996), (Schindel et al., 2001)). Lo que sí está claro es que tanto la influencia de la unión de calcio, la acilación y la región N-terminal de la toxina parecen ser importantes para la actividad lítica, pero no para la interacción con las membranas (Hyland et al., 2001).

Estudios previos realizados con células enteras, membranas lipídicas planas y liposomas, han demostrado que la formación de poros es el responsable de la actividad citotóxica de la toxina, aunque algunos resultados acerca de la estructura del mismo han sido contradictorios. Un grupo de investigación encontró una relación lineal entre la conductancia de la membrana y la concentración de HlyA, concluyendo que la proteína actúa como monómero (Menestrina, 1988), (Menestrina et al., 1987); mientras que otro grupo encontró una relación no lineal sugiriendo la cooperatividad y oligomerización de HlyA en el proceso de formación del poro (Benz et al., 1992), (Benz et al., 1989).

En un trabajo realizado recientemente en colaboración con la Dra. Bakás *et al*, hemos encontrado que el agregado de concentraciones nanomolares de HlyA a

membranas lipídicas planas producen un descenso en el tiempo medio de vida de la membrana, dependiendo del voltaje aplicado, un comportamiento típico de un poro proteolipídico (Bakás et al., 2006).

Moayeri and Welch demostraron que la protección osmótica de los eritrocitos por varios azúcares es función de la concentración de HlyA y del tiempo del ensayo. Parecería ser que HlyA induce lesiones en los eritrocitos que aumentan en tamaño con el tiempo, y que la velocidad de dicho incremento es dependiente de la temperatura (Moayeri and Welch, 1994).

Por otro lado, HlyA se recupera en forma monomérica de membranas de eritrocitos solubilizados con deoxicolato, sugiriendo que no es necesario la oligomerización de la proteína para la formación del poro, o que el oligómero se disocia con el agregado de detergente (Bhakdi et al., 1986).

Por lo expuesto hasta ahora los trabajos realizados con ProHlyA están relacionados principalmente con su interacción con membranas y poco es lo que se sabe de los cambios conformacionales que estos pueden producir cuando la proteína está en solución. Es por eso que en este capítulo se estudió el rol que tiene los ácidos grasos en la conformación de HlyA en solución. A la vez los resultados publicados hasta la fecha, muestran que los ácidos grasos no tienen implicancia en la interacción con membranas, pero alguna diferencia en dicha unión debe haber ya que HlyA es hemolíticamente activa mientras que ProHlyA no. Es por eso que en este capítulo también se estudió el rol de los ácidos grasos en el mecanismo de unión a la membrana, en especial en la inserción irreversible de la toxina a si como su posible implicancia en el proceso de oligomerización. Finalmente, se estudió si los rafts presentes en los eritrocitos contribuyen a la oligomerización.

2. *Materiales y Métodos*

Parte A: En solución

2A.1 Purificación de las proteínas

Todas las proteínas utilizadas en este capítulo (HlyA, ProHlyA y mutantes de cisteína) se purificaron según el protocolo descrito en materiales y métodos generales.

2A.2 Desnaturalización con GnCl

La emisión de fluorescencia del Trp fue utilizada para evaluar la desnaturalización química de HlyA y ProHlyA. Para esto se midieron los espectros de emisión luego de incubar ambas proteínas (10 µg/ml) durante 2 hs en distintas concentraciones de cloruro de guanidinio (Sigma), desde 0 a 5 M en buffer TC a 25 °C. La longitud de onda de excitación fue de 295 nm y la emisión se midió entre 320-400 nm, usando cubetas de 150 µl. La relación de fluorescencia 350 nm a 330 nm (X) se utilizó para cuantificar la fracción molar de moléculas de proteínas desnaturalizadas f_D , (Lackowicz, 1984) como:

$$f_D = \frac{X_X - X_{\text{GnCl } 0\text{M}}}{X_{\text{GnCl } 6\text{M}} - X_{\text{GnCl } 0\text{M}}}$$

donde X_X es la relación de fluorescencia a cada concentración de GnCl estudiada.

2A.3 Unión de ANS a HlyA y ProHlyA en solución

ANS (ácido 1-anilino-8-naftalensulfónico) es una sonda que no fluoresce en medio acuoso, pero su rendimiento cuántico aumenta significativamente cuando se une a sitios hidrofóbicos de las proteínas. Por esta razón se utiliza esta sonda para evaluar cuantitativamente la superficie hidrofóbica de una proteína en su estado nativo (Cardamone and Puri, 1992).

La interacción de HlyA o ProHlyA con ANS fue analizada en el

espectrofluorómetro Perkin Elmer LS50B, utilizando una cubeta de 150 μl a 25 $^{\circ}\text{C}$. Se realizó la titulación de una solución 10 μM de ANS con cantidades crecientes de proteína. La longitud de onda de excitación utilizada fué de 350 nm, y la fluorescencia de emisión se midió entre 420 y 600 nm con un *slit* de 5 nm para excitación y emisión. La titulación de ANS se realizó por triplicado para cada proteína.

La estequiometría y la constante de disociación (K_d) para la unión de ANS a HlyA o ProHlyA fueron calculadas usando el análisis de Klotz descrito en Maity and Kasturi (Maity and Kasturi, 1998).

Si consideramos que la proteína (P) se une al ANS (A) para formar un complejo de acuerdo a la siguiente reacción:



La constante de disociación, K_d se puede definir como:

$$K_d = \frac{[P] [A]}{[PA]} \quad (2)$$

Si asumimos que hay n sitios de unión independientes de ANS por molécula de proteína, y que el rendimiento cuántico de cada sitio es igual, la ecuación anterior la podemos escribir como:

$$K_d = \frac{(n [Pt] - [PA]) [A]}{[PA]} \quad (3)$$

donde $(n [Pt] - [PA])$ corresponde al número de sitios disponibles, y $[Pt]$ es la concentración total de proteína. La ecuación 3 se puede escribir como:

$$\frac{[Pt]}{[PA]} = \frac{K_d + 1}{n[A]} \quad (4)$$

Si $[A] = [At] - [PA]$, donde $[At]$ es la concentración total de ANS. Sustituyendo en ec. 4, se obtiene:

$$\frac{[Pt]}{[PA]} = \frac{K_d}{n[At] (1 - [PA]/ [At])} + \frac{1}{n} \quad (5)$$

Sabiendo que

$$[PA] = \frac{F_{\text{obs}} [At]}{F_{\text{max}}}$$

La ec. 5 se puede escribir como:

$$\frac{[Pt]}{F_{\text{obs}} / F_{\text{max}} [At]} = \frac{K_d}{n[At] (1 - F_{\text{obs}} / F_{\text{max}})} + \frac{1}{n} \quad (6)$$

donde F_{obs} es la intensidad de fluorescencia a una concentración dada de ANS y F_{max} es la fluorescencia máxima cuando todas las moléculas de ANS están unidas a la proteína. Para determinar el incremento de fluorescencia por mol de ANS unido, se graficó $1/\Delta F$ versus $1/[proteína]$. De la extrapolación a concentración infinita de proteína ($1/[proteína] = 0$) se calculó $1/\Delta F = 1/\Delta F_{\text{max}}$.

Para los ensayos de transferencia de energía, las muestras fueron excitadas a 295nm y la fluorescencia de emisión se midió entre 300 y 500 nm.

2A.4 Medida de la fluorescencia intrínseca

Se midió la fluorescencia emitida por la proteína entre 320-400 nm. Se excitaron las muestra de HlyA y ProHlyA (10 ug/ml) a 295 nm con un *slit* de 8 nm, tanto para la excitación como para la emisión.

2A.5 Digestión con tripsina de HlyA y ProHlyA

Con el propósito de evaluar diferencias en la conformación que presentan en solución ambas proteínas, se realizó la digestión controlada con tripsina. Esta proteasa corta preferentemente hacia el extremo carboxílico de los residuos Arg y Lys, con mayor velocidad para Arg, principalmente cuando la reacción ocurre a pH alcalinos (Keil, 1992).

Se utilizó una relación proteína:tripsina de 5:1, tomándose muestra a 0, 1, 5, 15 y 30 minutos. La reacción a los distintos tiempos se frenó con una concentración final de 0.1 mM de PMSF (inhibidor de tripsina).

Los distintos fragmentos de proteólisis se visualizaron en un SDS-PAGE 10 %. Se sembró la misma cantidad de todas las muestras y el gel se reveló por tinción con

Comassie Blue. Para calcular la cantidad de cada una de las proteínas a distintos tiempos se empleó el software Kodak digital Science 1D Software.

2A.6 Predicción de regiones desordenadas

Se analizaron los posibles sitios de desorden en la ProHlyA, utilizando el predictor basado en redes neurales PONDR VSL1 (*Predictor of Naturally Disordered Regions*) disponible en la web (www.pondr.com), desarrollado por K. Peng y Z. Obradovic. Se eligió este predictor por ser el que arrojó mejores resultados en la predicción de diferentes proteínas testeadas por Dunker (Dunker et al., 2005).

Parte B: En membranas

2B.1 Purificación de los mutantes de cisteína

Las cepas utilizadas para la purificación de los mutantes fueron WAM 2202(K690C), WAM 2203(R370C), WAM 2197(K564C), WAM 2205(K345C) y PRO 345 (K345C de ProHly), todas ellas excepto PRO 345 fueron donados gentilmente por el Dr. Welch. Para la construcción de la cepa PRO 345 se realizó mutagénesis dirigida de la cepa WAM 783 (*E.coli* DH1 transformada con el plásmido SF4000 Δ BamHI, donde una porción del gen de *hlyC* fue eliminada) (Boehm *et al.* 1990), y se sustituyó la lisina en posición 345 de la proteína no acilada por una cisteína.

2B.1.1 Construcción de mutante PRO 345:

Para la construcción de este mutante primero se extrajo el ADN plasmídico de la cepa WAM 783, al cual se le mutó K345 por C por mutagénesis dirigida. Finalmente se transformaron células de *E.coli* JM 109, para expresar la proteína y así poder purificarla.

2B.1.1.a Obtención de plásmidos en escala analítica (minipreparación)

Básicamente consiste en realizar una lisis alcalina con el detergente SDS para producir la liberación del plásmido de las bacterias transformadas. El lisado se purifica para eliminar restos celulares, proteínas y el ADN cromosómico. Este método permite obtener suficiente cantidad de ADN plasmídico para realizar la mutación puntual .

Se transfirieron colonias individuales a tubos con 2 ml de medio LB conteniendo

cloranfenicol (10 µg / ml) y se incubaron toda la noche a 37°C con agitación fuerte. Luego se transfirió en forma estéril aproximadamente 1,5 ml del cultivo a un tubo Eppendorff de 1,5 ml (conservándose el resto a 4°C). Se centrifugó a 12.000 x g durante 2 min a 4°C resuspendiendo luego el *pellet* con 100 µl de solución I (25mM Tris-HCl pH 8.0; 10mM EDTA pH 8.0; Glucosa 50 mM), con agitación en vórtex. A fin de disolver el precipitado, se agregaron 200 µl de solución II (NaCl 0,2M; 1%SDS) recientemente preparada, manteniéndose la mezcla en hielo por 5 min. A continuación se adicionaron 150 µl de solución III (60 ml de Acetato de potasio 5M; 11,5ml de ácido acético; agua destilada csp 100 ml) previamente enfriada en hielo. Se incubó en hielo durante 5 min. Se centrifugó a 12.000 x g por 5 min a 4°C transfiriéndose el sobrenadante a un tubo limpio. Luego se adicionaron 450 µl de fenol-cloroformo (SS-fenol; 0.1% de 8-hidroxiquinoleína; cloroformo; 2% de alcohol isoamílico) y luego de incubarse 5 min se centrifugó la mezcla a 12.000 x g rescatándose la fase acuosa superior.

A este sobrenadante se lo mezcló con 2,5 volúmenes de etanol al 96% y 0,1 volúmenes de solución de acetato de sodio 3M (pH 7,4) y se mantuvo a -20°C durante 15-30 min. Se centrifugó a 15.000 x g durante 15 min, y el sedimento se lavó con alcohol al 70%. Luego se lo centrifugó a 15.000 x g durante otros 5 min y se secó al vacío. El sedimento fue resuspendido en 200 µl de buffer TE al cual se le adicionó 200 µl de solución de PEG 13% en 1,6M de NaCl y se incubó en hielo 30 min. Luego de una centrifugación a 15.000 x g durante 15 min, el nuevo sedimento fue lavado con etanol al 70%, centrifugado, secado al vacío y resuspendido en 20 µl de TE. Se adicionó solución de RNAsa hasta una concentración final de 20 µg/ml. Se conservó a -20°C hasta su utilización (Sambrook, 2001).

##Alternativamente se empleó el kit de promega de minipreparación de plásmidos acorde a protocolo estipulado por el fabricante. (QIAprep Miniprep kit Spin Procedure cat. Número 27104)

2B.1.1.b Electroforesis de inmersión en geles de agarosa

Para conocer el peso aproximado del plásmido extraído de WAM 783 se realizó un gel de agarosa al 0,8% p/v. El buffer de corrida en todos los casos fue 1X buffer TBE (Tris-borato/EDTA) y las bandas fueron observadas por iluminación del gel con luz UV. Los standards de peso molecular para ADN empleados fueron de 10kb. El voltaje

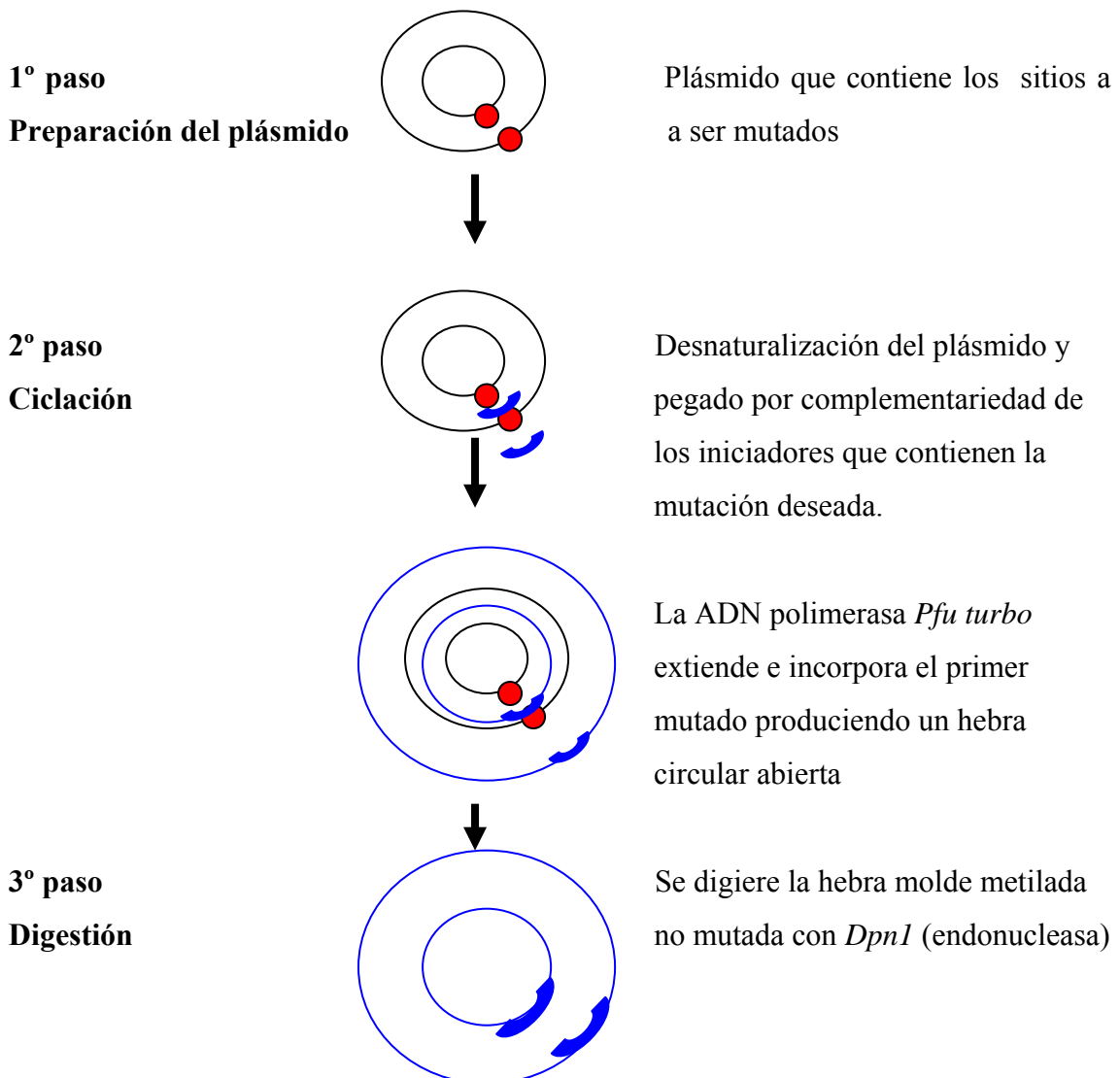
empleado fue de 120 V. Para la visualización del plásmido, se adicionó 0,5µg/ml de bromuro de etidio en el gel. Iluminando el gel con luz UV, se pudo observar la presencia de las bandas de ADN, tomándose las fotos correspondientes para registrar los datos.

2B.1.1.c Mutagénesis dirigida

La técnica consiste en realizar una mutación sitio específica, utilizando ADN de doble hebra. Se realizó según especificaciones del catálogo del kit QuickChange- Site Directed Mutagenesis (Stratagene, catálogo # 200518). Se construyó un iniciador de 39 pares de bases, que contiene la mutación K345C. A continuación se muestra la secuencia del mismo, destacando en rojo la mutación introducida:

Cepa salvaje 5' GGAGTATTCACAACGATTCAAAAACTTGGATACGATGG 3'
 Cepa mutada 5' GGAGTATTCACAACGATTCAAA**TGC**CTTGGATACGATGG 3'

Brevemente a continuación se adjunta un esquema de la técnica:



4° pasoSe transformaron *E.coli* JM 109**Transformación**

con estos ADN doble hebra

A continuación se detalla el tiempo, la temperatura y la cantidad de ciclos realizados para realizar esta mutación puntual del plásmido de ProHlyA.

Segmento	Nº de Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95 °C	30 seg
2	18	95 °C	30 seg
		65 °C	1 min
		72 °C	12 min

2B.1.1.d Transformación bacteriana con los plásmidos mutados amplificados

Preparación de bacterias competentes con Cloruro de Calcio

Para tales fines se emplearon bacterias *E. coli* cepa JM109, la cuales se sembraron en placas de agar 1,5%-LB (triptona 10g/l; extracto de levadura 5g/l; NaCl 10g/l; PH=7) y se incubaron a 37 °C durante 12 horas. Luego se transfirió una colonia a 50ml de medio LB y se la incubó en iguales condiciones con agitación intensa hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0,3-0,5. Las células se transfirieron asépticamente a un tubo de centrifuga estéril y se las mantuvo en hielo durante 10 min. Se centrifugaron a 2.500 x g durante 10 min. y se resuspendieron en 5 ml de solución 0,1 M de CaCl₂ estéril enfriado en hielo. Se centrifugó nuevamente (a 2.500 x g. durante 10 min.) y el precipitado se volvió a resuspender en 1 ml de solución 0,1 M de CaCl₂ estéril, conservándose a 4 °C entre 12 y 24 hs.

Las bacterias competentes así preparadas pueden ser utilizadas inmediatamente o guardarse congeladas por varios meses, para lo cual se les adicionó 20% de glicerol estéril, se las congeló inmediatamente y se las mantuvieron en freezer a -70 °C.

Transformación de bacterias competentes

Se adicionó a 0,2 ml de una suspensión de células competentes, 100 ng del

ADN transformante y se mantuvo en hielo durante 30 min. Se transfirió el tubo a un baño de agua a 42°C y se mantuvo durante 90 seg. Inmediatamente se colocó en hielo y se agregó 0,8 ml de medio SOC [bacto-triptona 20g/l; extracto de levadura 5g/l; NaCl 0,584g/l; KCl 0,186g/l; 10ml de Glucosa 2M y 10ml de solución stock de Mg (MgCl₂.6H₂O 20,33%, MgSO₄.7H₂O 24,65%); pH=7] incubándose 40 min. a 37 °C. Luego se centrifugaron las bacterias y se las resuspendió en el menor volumen posible. Se sembraron placas de agar LB con cloranfenicol (10 µg/ml de medio de cultivo) con las bacterias preparadas previamente y se incubaron en estufa a 37°C durante una noche para que desarrollen los transformantes. También se sembraron placas con bacterias competentes sin plásmido como controles negativos.

Luego se tomaron tres colonias, las cuales se crecieron toda la noche a 37°C en LB líquido, se extrajo el ADN plasmídico y se realizó nuevamente un gel de agarosa para determinar si su peso era de 12 Kb y así poder descartar alguna contaminación con otra bacteria.

2B.1.1.e Obtención de plásmidos en escala preparativa (maxipreparación)

Se realizó la obtención de plásmidos en escala preparativa para obtener cantidades suficientes de plásmido que permitan secuenciarlo y corroborar la mutación. El cultivo de bacterias que incorporaron el plásmido de interés se incubó en 100 ml de medio LB conteniendo cloranfenicol (10 µg / ml) durante 12-16 hs a 37°C con agitación enérgica. Se centrifugó a 5.000 x g por 10 min y las bacterias fueron resuspendidas en 2 ml de Solución I, (idem a protocolo de minipreparación). Se adicionaron 4 ml de Solución II y se incubó 5-10 min a temperatura ambiente. A esta mezcla se le agregó 3 ml de Solución III y se incubó en hielo por 10 min. Luego de centrifugar a 12.000 x g durante 10 min y rescatar el sobrenadante, se adicionó 0,6 volúmenes de isopropanol, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min rescatándose los sedimentos obtenidos, los cuales fueron posteriormente resuspendidos en buffer TE. Se adicionó RNAsa (libre de DNAasa) a una concentración final de 20 µg/ml y se incubó a temperatura ambiente por 15-30 min. Se agregó 0,5 ml de fenol, se mezcló en vortex por 1-2 min y se centrifugó a 12.000 x g por 5 min. La fase acuosa superior fue rescatada y se repitió esta operación sobre la fase acuosa, tantas veces como fuese necesario para purificar el plásmido obtenido.

La fase acuosa fue rescatada y se le adicionó un 10% del volumen total de solución de acetato de sodio 3M más 2,5 volúmenes de etanol al 96%. Se incubó a – 20°C por 15-30 min y se centrifugó a 12.000 x g por 15 min. Los sedimentos luego de ser lavados con alcohol al 70% y secados al vacío fueron disueltos en buffer TE para ser utilizados.

Para su cuantificación se determinó su absorbancia a 260 nm, evaluando la contaminación de proteínas a 280 nm.

Los plásmidos extraídos fueron secuenciados por Macrogen S.A (Kumchun-ku, Seoul, Corea), corroborando la existencia de la mutación.

2B.2 Preparación de liposomas

Se siguió el protocolo descrito en materiales y métodos generales. Los LUV empleados fueron de 1 palmitoil, 2-oleil-fosfatidilcolina (POPC). Para preparar los LUV con doxilo-POPC, se agregó a la solución inicial de POPC en cloroformo, un 2% (moles) de doxilo-POPC. Luego se continuó como se describe en el protocolo.

Se prepararon LUV de POPC marcados con N-(7 nitro 2,1,3 benzoxadiazol-4 il fosfatidiletanolamina (NBD-PE) y rodamina fosfatidiletanolamina (Rh-PE) (Molecular Probes), en una relación molar 100:0.6:0.6, para la cual se observa una eficiencia de 100% de transferencia de energía (TE).

2B.3 Interacción de HlyA y ProHlyA con membranas

La interacción de ambas proteínas con membranas se siguió por cambios en los espectros de emisión de los triptófanos. Se agregó 10 ug de proteína (HlyA or ProHlyA) a cubetas de 1 ml conteniendo buffer TC (20 mM Tris, 150 mM NaCl , 10 mM CaCl₂ pH 7.0). Luego se agregaron LUV hasta una concentración final de 0.2 mM. A esta relación lípido: proteína aproximadamente el 90% de la proteína se encuentra unida a los LUV (Ostolaza, 1995). Después de 10 minutos de incubación, se midieron los espectros de emisión entre 320-400 nm. Las medidas de fluorescencia fueron corregidas por el factor de dilución y dispersión de luz (Surewickz, 1984).

2B.4 Transferencia de las proteínas unidas a LUV de POPC a LUV de doxilo-POPC

El método empleado fue una modificación por el descrito por Bakás *et al* (Bakás, 1996) para medir la unión reversible e irreversible de la toxina a membranas, pero en este caso, los eritrocitos fueron reemplazados por LUV de doxilo-POPC para evaluar la transferencia, ya que ProHlyA no tiene actividad hemolítica.

Se incubaron 25 ug de MLV de POPC con 50 ug/ml de cada una de las proteínas durante 2 hs. Luego se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 14000 rpm a 4°C, y se lavaron 2 veces con buffer hemólisis con la finalidad de eliminar la proteína no asociada a las membranas. Finalmente se agregaron los LUV conteniendo doxilo-POPC (25 ug), y se cuantificó la transferencia por descenso en la fluorescencia del Trp por la presencia de doxilos en las membranas aceptoras que actúa como apagador.

2B.5 Cálculo del área ocupado por HlyA y ProHlyA unidas a membranas

Para calcular el área ocupada por cada una de las proteínas unidas a membranas se realizó la titulación de LUV de POPC marcados con NBD-PE y Rh-PE en relación molar 100:0.6:0.6 con cantidades crecientes de proteína. Se midió la eficiencia de TE como descenso de la fluorescencia del aceptor como consecuencia de la separación de las sondas por inserción de la proteína. Las muestras fueron excitadas a 467 nm y la emisión se midió entre 480 y 620 nm.

Como demostraron Fung y Stryer (Fung, 1978), en el caso de distribución al azar de donador y aceptor en un plano de la membrana, la eficiencia de TE se puede definir como:

$$E = 1 - \frac{1}{\tau_0} \int_0^{\infty} \exp(-t/\tau_0) \exp\left[-\sigma_a \int_a^{\infty} X \left[1 - \exp(-t/\tau_0)(R_0/r)^6\right] 2\pi r dr\right] dt$$

donde R_0 es el radio de Foerster para el par donador/aceptor, σ_a es la densidad superficial del aceptor, τ_0 es el tiempo medio de fluorescencia del donador en ausencia de aceptor. El segundo exponente de la ecuación corresponde al término de transferencia de energía. La integración se realiza a lo largo de todo el rango de distancias posibles entre el

aceptor y el donador (r), comenzando a partir de a (la menor distancia entre donador y aceptador). La eficiencia de TE es independiente de la densidad superficial de donador y no es muy sensible a a . La integración cuantitativa muestra que para un radio de Förster entre 20-60 Å, la eficiencia es aproximadamente proporcional a la densidad superficial del aceptador (σ_a). Si se tiene en cuenta la siguiente relación:

$$\sigma_a = (n_a / n_l) / s_1 \Delta S = s_p * p S_0 = s_1 * l$$

donde s_1 es el área que ocupa una molécula de lípido, s_p es el incremento de la superficie en la membrana por la inserción de una molécula de proteína, n_a / n_l es la fracción molar de moléculas de aceptador en la membrana, ΔS es el cambio de la superficie de la membrana (S_0), p es la concentración de proteína unida, l es la concentración de lípidos, ΔE es el cambio de eficiencia de energía (E_0). Entonces la aproximación lineal es:

$$\Delta E / E_0 = -\Delta S / S_0 = -s_p / s_1 * p / l$$

Por lo tanto, la pendiente del gráfico $\Delta E / E_0$ vs p/l dará la relación del incremento de área debido a la presencia de una molécula de proteína, comparada con el área que ocupa una molécula de lípido. Sabiendo que s_1 de **DOPC** $\approx 70 \pm 4 \text{ \AA}^2$ / lípido se puede calcular el área que ocupa la proteína insertada.

Para calcular la cantidad de proteína unida se utilizaron los porcentajes de unión encontrados por Ostolaza *et al* para cada cantidad de proteína agregada (Ostolaza, 1995)

2B.6 Marcado de los mutantes con sondas fluorescentes

Los mutantes de HlyA en TC / ClGn 6M pH fueron incubados con sondas específicas para sulfhidrilos a temperatura ambiente, durante 1 h en presencia de 0.4 mM TCEP(cloruro de tris (2-carboxietil) fosfina), reductor de grupos sulfhidrilos. Las sondas disueltas en el mismo buffer se agregaron en pequeños volúmenes y con agitación continua en la oscuridad. ALEXA-488 (F) se agregó en una relación molar final de 30:1, sonda:proteína; y un exceso molar de 5:1 y en presencia de 0.1% de colato de sodio para ALEXA-546 (R). Las proteínas marcadas se separaron de la sonda libre por elución a través de columnas PD-10 (Pharmacia) y se dializaron toda la noche en buffer TC. Se calculó la eficiencia de marcado de la siguiente manera:



$$\text{Eficiencia de marcado} = f_D = [\text{sonda}]/[\text{proteína}]$$

$$[\text{sonda}] = A_{\text{PS}}^{\text{máx}} / \epsilon_{\text{sonda}}$$

$$[\text{proteína}] = \frac{A^{280} - A^{\text{máx}}}{\epsilon_{280 \text{ prot}}} \times C_f$$

Los coeficientes de extinción utilizados fueron $67\,100 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ y $90\,300 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ para ALEXA-488 y ALEXA-546, respectivamente (especificaciones de Molecular Probes). Y $\epsilon_{280 \text{ prot}} = 73960 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ para HlyA (calculado a partir de la secuencia primaria (Menestrina, 1995)). La marcación de los mutantes fue específica, obteniéndose una relación molar 0.9 a 1.1 sonda:proteína.

2B.7 Pureza y actividad de los mutantes de HlyA

La pureza de los mutantes se verificó en un gel SDS 10%, donde se observó una contaminación del 10% aproximadamente. La actividad hemolítica no se afectó por el proceso de marcado. Los mutantes K690C y PRO 345 no tienen actividad por carecer de uno o los dos ácidos grasos.

2B.8 Preparación de fantasmas de eritrocitos de carnero

Se centrifugaron 3 ml de eritrocitos de carnero a 1500 rpm durante 10 min. Luego se realizaron sucesivos lavados con solución fisiológica hasta que la fase superior quedó límpida. A continuación se agregaron 40 ml de buffer de lisis (tris 10 mM, pH 7.4) a 4°C durante 10 min. Finalmente se obtuvieron los fantasmas por centrifugación a 11500 rpm durante 15 min. y se resuspendieron en 1,5 ml de buffer TC.

La concentración de fosfolípidos de los eritrocitos se determinó cuantificando la cantidad de fósforo inorgánico de la muestras (Chen, 1956).

2B.9 Depleción de colesterol de fantasmas de eritrocitos de carnero

Para deplecionar de colesterol a los eritrocitos de carnero se los incubó 30 min a 37°C con una solución 3mM de β metilciclodextrina en buffer TC. Luego se centrifugaron los eritrocitos a 1500 rpm, y se los lisó hipotónicamente para obtener los fantasmas como se describió anteriormente.

2B.10 Unión de los mutantes de HlyA marcados a los fantasmas de eritrocitos de carnero

Se agregaron 10 μ g de proteína marcada a 75 μ l de fantasmas de eritrocitos de carnero en presencia de 10 mM de CaCl_2 , y las muestras se incubaron a 37°C durante 1 h. Luego se lavaron 2 veces con TC, centrifugándose a 11500 rpm, 10 min a 4°C, para separar la proteína libre de la unida. Finalmente se resuspendió la muestra en 1,5 ml de TC.

La relación lípido:proteína empleada corresponde a concentraciones líticas de la proteína.

Para cada mutante de HlyA analizado se prepararon tres muestras: **(a)** F/HlyA (relación molar, 1:1); **(b)** F/R (relación molar, 1:1); y **(c)** HlyA/R (relación molar, 1:1), siendo F, la toxina marcada con Alexa 488 y R, aquella marcada con Alexa 546.

2B.11 Medidas de transferencia de energía para estudiar la oligomerización

Cuando el donador y aceptor de los experimentos de transferencia de energía (TE) 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 estos experimentos, ALEXA-488 (F) y ALEXA-546 (R) se eligieron como donador y aceptor, respectivamente. Se eligió el método (a) para la determinación de la eficiencia de transferencia de energía.

Determinación de la transferencia de energía por aumento de la fluorescencia de emisión del aceptor:

La eficiencia de TE (E) se calculó a partir de el espectro de emisión de fantasmas conteniendo F/R excitando al donador a 460 nm (F^{FR}) y el espectro de la muestra HlyA/R también excitando a 460nm (F^R).

$$E = \frac{\epsilon^A(460)}{\epsilon^D(460)} \left[\frac{F^{FR}(\lambda_{em})}{F^R(\lambda_{em})} - 1 \right] (1/f_D)$$

Los coeficientes de extinción utilizados fueron para ALEXA-488 (D) $\epsilon_{492} = 67\,100 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ y para ALEXA-546(A) $\epsilon_{492} = 36028 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, calculado a partir del espectro de absorción. La fracción de marcado se calculó como $f_D = [\text{sonda}] / [\text{proteína}]$

Los espectros de fluorescencia se midieron a temperatura ambiente excitando a ALEXA-488 a 460 nm y la fluorescencia de emisión se midió entre 470 y 600 nm. La excitación directa de ALEXA-546 se realizó a 530nm y la emisión se midió entre 540 y 600 nm.

3. Resultados y Discusión

Parte A: Rol de los ácidos grasos en la estructura y función de HlyA en solución

3A.1 Purificación de ProHlyA

En la Fig.VA.1 se muestra el SDS-PAGE 10% de la purificación de ProHlyA a partir de cuerpos de inclusión, según la técnica descrita por Sanchez-Magraner *et al* (Sanchez-Magraner *et al.*, 2006) y detallada en la sección Materiales y Métodos generales.

Fig.VA.1

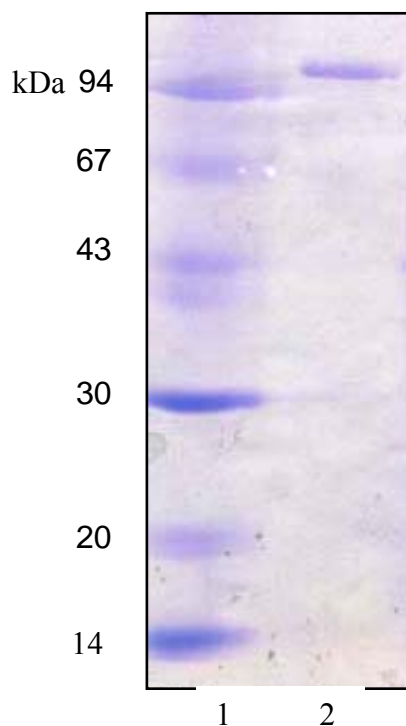


Fig VA.1: SDS-PAGE 10 % de ProHlyA
1: estándar de peso molecular, 2: ProHlyA, teñido por Coomassie Blue. Se sembró 10 ug de proteína

Como se muestra en la Fig.VA.1 se obtiene ProHlyA altamente pura realizando esta técnica de purificación.

3A.2 Desnaturalización con GnCl de ProHlyA y HlyA

El estudio de la desnaturalización de proteínas es una medida de la estabilidad conformacional de las mismas. A partir de la relación F350/F330 se estimó f_D . El aumento de esta relación indica un corrimiento hacia el rojo de la fluorescencia de los Trp, indicando una exposición de los mismos a un entorno más polar en el estado desnaturalizado.

Fig.VA.2

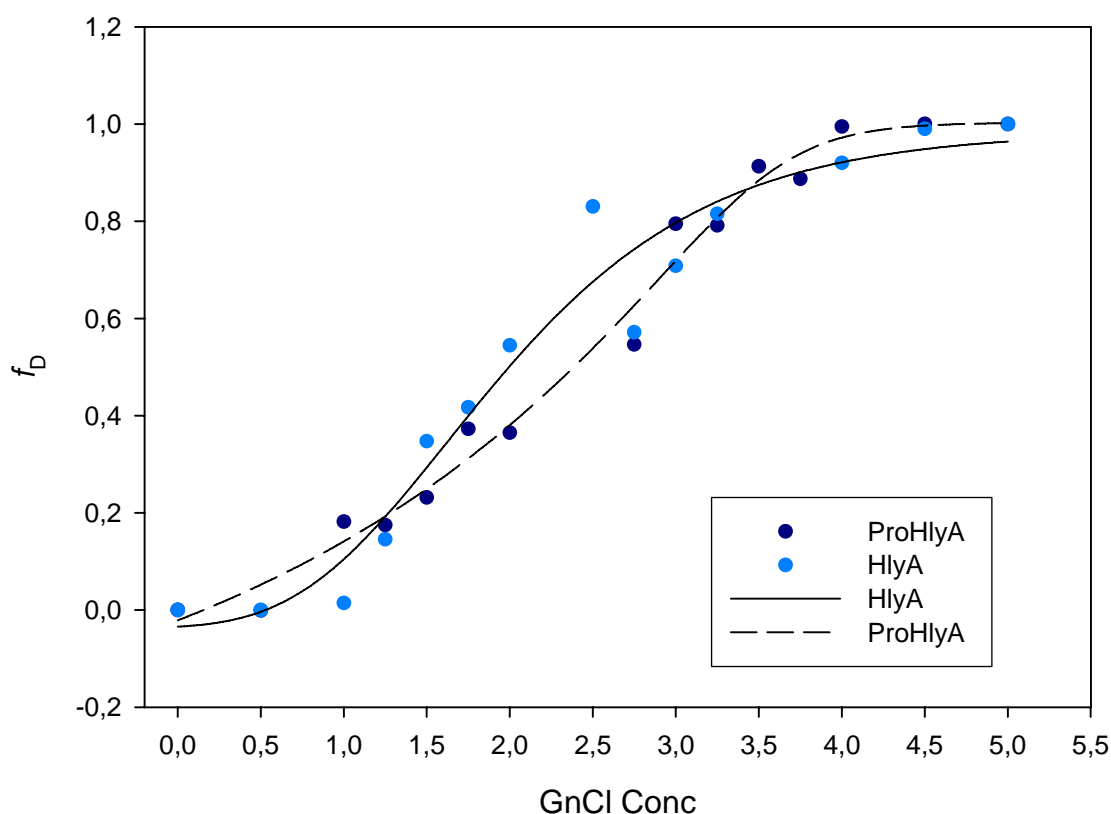


Fig. VA.2: Desnaturalización química de HlyA (●) y ProHlyA (●)

En la Fig.VA.2 se puede ver que la transición de desnaturalización alcanza una meseta, por lo que los datos experimentales se ajustan perfectamente a una transición de dos estados. La concentración de GnCl para alcanzar la mitad del estado de transición (C_m) es mayor para ProHlyA que HlyA. La transición de desnaturalización no es abrupta para ninguna de las dos proteínas, reflejando la existencia de diferencias locales en los entornos de desnaturalización de los distintos Trp.

Como el proceso de desnaturalización se ajusta a un evento de dos estados, se puede definir la constante de equilibrio $K=f_D/(1-f_D)$, y a partir de ella la energía libre de Gibbs para la reacción de desnaturalización a cada concentración de GnCl, $\Delta G^0 = -RT \ln K$ (Fig.VA.3).

Fig.VA.3

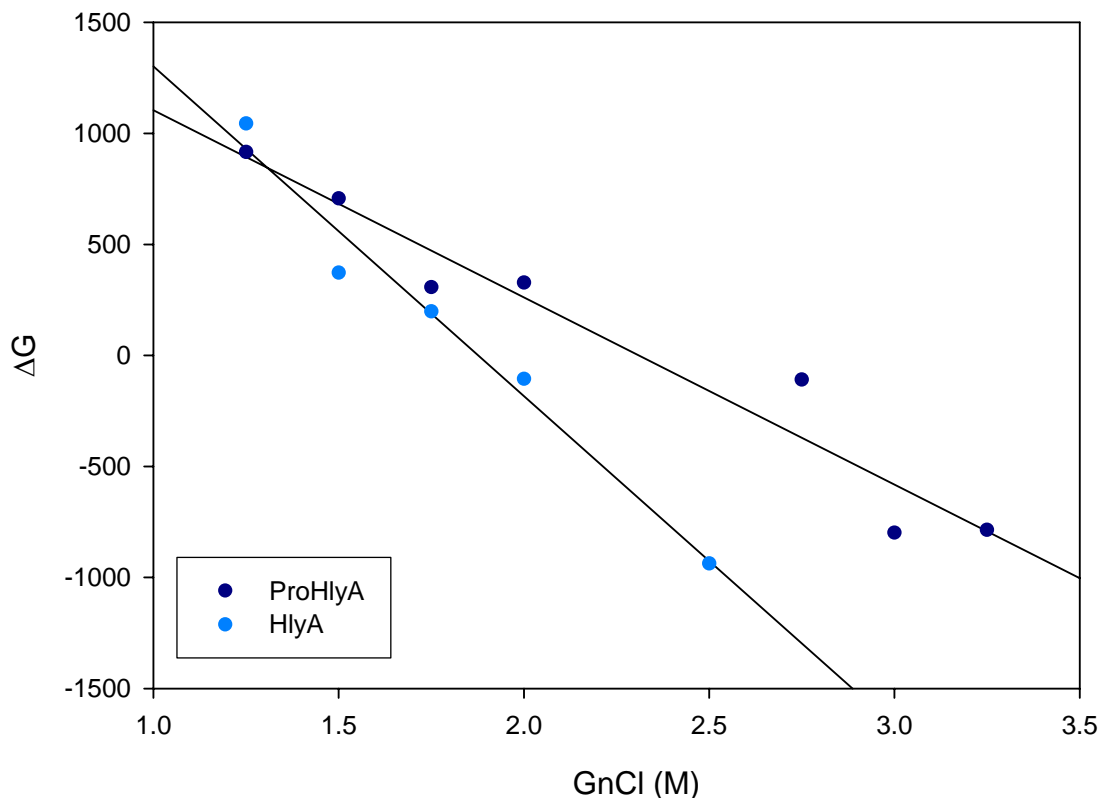


Fig. VA.3: Cálculo de ΔG^0 y m a partir de la gráfica ΔG vs conc. GnCl para HlyA (●) y ProHlyA (●)

La relación de ΔG^0 con la concentración de GnCl se puede ajustar a la siguiente ecuación lineal:

$$\Delta G^0 = \Delta G^0_{H_2O} - m [\text{GnCl}]$$

donde $\Delta G^0_{H_2O}$ corresponde a la energía libre de la proteína en ausencia de desnaturalizante y representa la estabilidad conformacional de la misma. m es un coeficiente proporcional a la cantidad de regiones hidrofóbicas de la proteína que se exponen al solvente durante el proceso de desnaturalización (Myers et al., 1995).

Como se muestra en la Fig.VA.3 tanto $\Delta G^0_{H_2O}$ como m son dependientes de la acilación, siendo ProHlyA más estable en ausencia de desnaturalizante que HlyA, como lo demuestra el menor valor de $\Delta G^0_{H_2O}$. Es interesante notar que GnCl estabiliza el

estado desnaturalizado de HlyA mas que el estado desnaturalizado de ProHlyA, como se muestra en la Fig.VA.3. ΔG^0 disminuye para HlyA mas rápidamente a medida que aumenta la concentración de GnCl, debido a la mayor exposición de regiones hidrofóbicas, como surge del mayor valor de m . A concentraciones mayores a C_m , HlyA se vuelve más estable que ProHlyA.

Por otro lado, los ácidos grasos unidos covalentemente le imponen un impedimento estérico a la proteína, otorgándole una estructura mas laxa que explicaría la menor concentración de GnCl necesaria para su desnaturalización. Los valores de C_m , $\Delta G^0_{H_2O}$ y m se detallan en la tabla VA.1.

Tabla VA.1

	C_m GnCl (M)	m	ΔG^0 (cal/mol)
HlyA	2.65	803.93	2379.5
ProHlyA	3.15	418.4	1441.07

Tabla VA.1: Resumen de los valores de C_m , $\Delta G^0_{H_2O}$ y m para HlyA y ProHlyA.

3A.3 Unión de ANS a HlyA y ProHlyA en solución

Para calcular los valores de Kd y n primero se graficó $1/\Delta F$ vs. $1/[proteína]$, para obtener el valor de F_{max} por extrapolación a concentración infinita de proteína ($1/[proteína]=0$).

Fig.VA.4

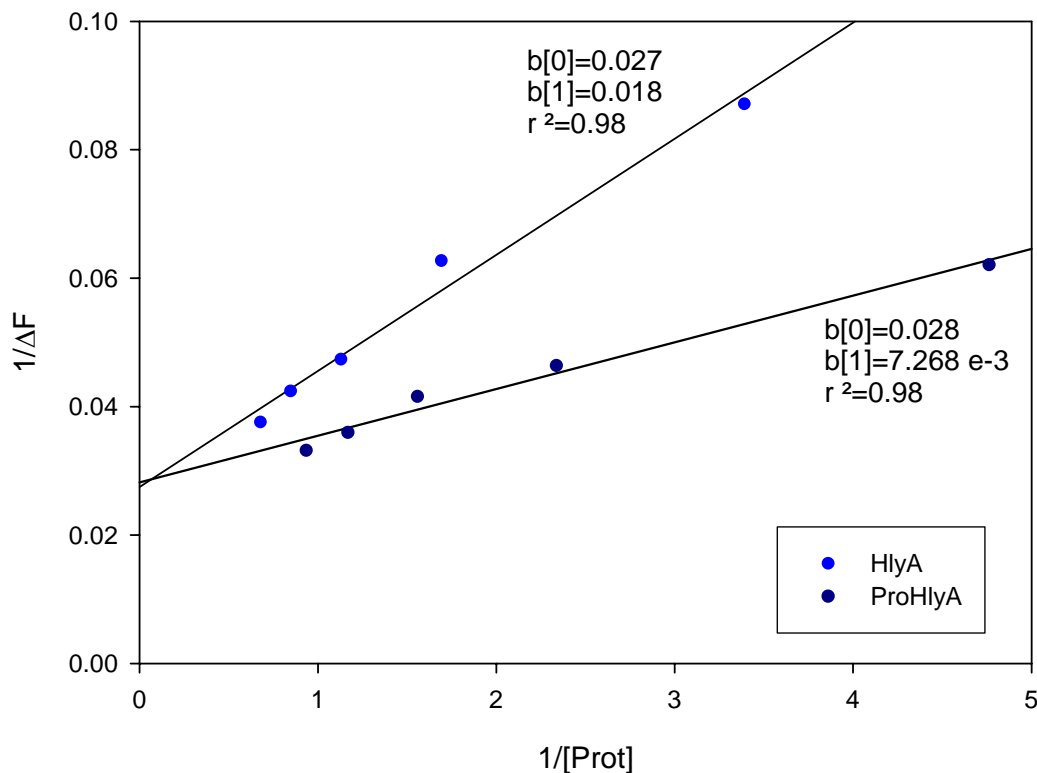


Fig. VA.4: Gráfico $1/\Delta F$ vs $1/[proteína]$ para el cálculo de $1/\Delta F_{max}$ para HlyA (●) y ProHlyA (●). $b[0] = 1/F_{max}$

Los valores de F_{max} calculados son: 3.7 y 3.34 unidades arbitrarias / μM ANS unido a HlyA y ProHlyA, respectivamente. Estos valores indican que el incremento de fluorescencia por cada mol de ANS unido es igual para ambas proteínas, sugiriendo un entorno para la sonda similar en ambos casos.

En la Fig.VA.5 se graficó $P_{tot}/((F_{obs}/F_{max}) \times [ANS]_t)$ vs $1/[ANS]_t(1-(F_{obs}/F_{max}))$ para calcular los valores de K_d (constante de disociación del complejo ANS-proteína) y n (número de moléculas de ANS unidas a las proteínas).

Fig.VA.5

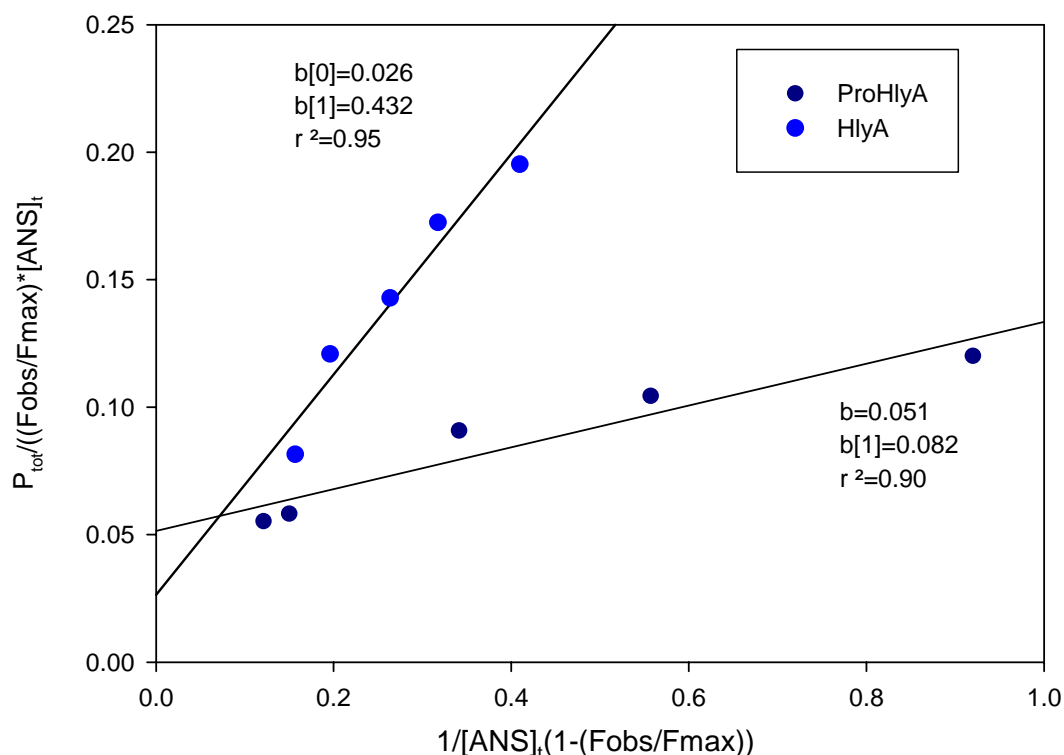


Fig. VA.5: Gráfico $P_{tot}/((F_{obs}/F_{max}) * [ANS])_t$ vs $1/[ANS]_t(1-(F_{obs}/F_{max}))$ para el cálculo de K_d y n para HlyA (●) y ProHlyA (●). $b = 1/n$ y $b[1] = K_d/n$

Los valores de K_d son 1.6 y 16.6 μM y n 19.6 y 38.5 para ProHlyA y HlyA, respectivamente. El alto número de moléculas de ANS unidas a ambas proteínas no es sorprendente ya que se han encontrado valores en el orden de 50 para otras proteínas, como por ejemplo, bacteriorodopsina. Este valor se debe al alto grado de hidrofobicidad que ésta tiene, debido a su localización celular ya que se encuentra insertada en la membrana de las bacterias (Cardamone and Puri, 1992). Por lo tanto el número de moléculas de ANS unidas a HlyA y ProHlyA puede deberse al alto contenido de regiones hidrofóbicas que estas tienen, aunque se observa que la presencia de ácidos grasos duplica este valor. La unión débil de un alto número de moléculas de ANS es característico de las proteínas con conformación glóbulo fundido. Los valores de K_d calculados de esta manera son valores promedio, ya que las moléculas de ANS se pueden unir a diferentes sitios con distintos rendimientos cuántico. Pero a pesar de estas

incertidumbres es útil para diferenciar proteínas ordenadas de las proteínas con estructura glóbulo fundido, ya que difieren en un factor de 5 o mas en sus K_d (Bailey et al., 2001). Estas diferencias se observan también para ProHlyA y HlyA, sugiriendo que los ácidos grasos unidos covalentemente inducen un estado glóbulo fundido.

3A.4 Espectros de fluorescencia intrínseca de HlyA y ProHlyA

En la Fig.VA.6 se muestran los espectros de emisión de HlyA y ProHlyA en solución.

Fig.VA.6

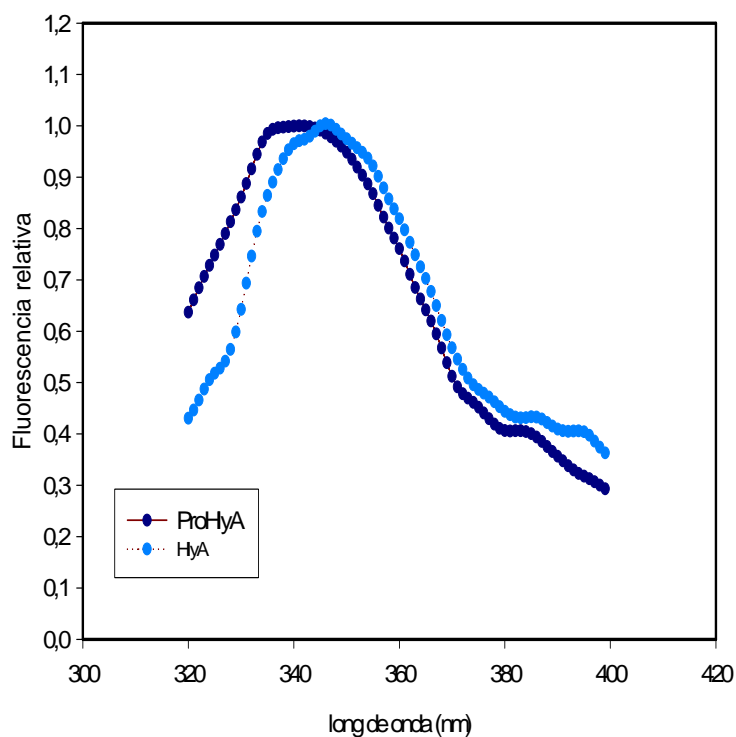


Fig VA.6: Espectros de emisión de ProHlyA (●) y HlyA (●). 10 ug de proteína. $\lambda_{Exc}=295nm$

En la Fig.VA.6 se observa que la longitud de onda para el máximo de emisión de HlyA en solución es 346 nm, mientras que para ProHlyA es de 341nm. Para una mejor comparación los espectros fueron normalizados. El espectro de ProHlyA sugiere que en solución, los Trp están localizados en un entorno más hidrofóbico respecto a la posición de estos residuos en la HlyA, debido al corrimiento hacia el azul del máximo de emisión. Por otro lado, la intensidad de fluorescencia de ProHlyA es mayor que HlyA (dato no mostrado), confirmando el entorno mas hidrofóbico de los Trp en ProHlyA, como consecuencia de una estructura mas compacta.

3A.5 Medidas de TE entre Trp y ANS para HlyA y ProHlyA

La transferencia de energía entre residuos de Trp y moléculas de ANS ha sido descrita por Long-sen *et al* (Long-sen et al., 1994). En la Fig.VA.7 se muestran los espectros de los complejos ANS-proteína para HlyA (A) y ProHlyA (B).

Fig.VA.7

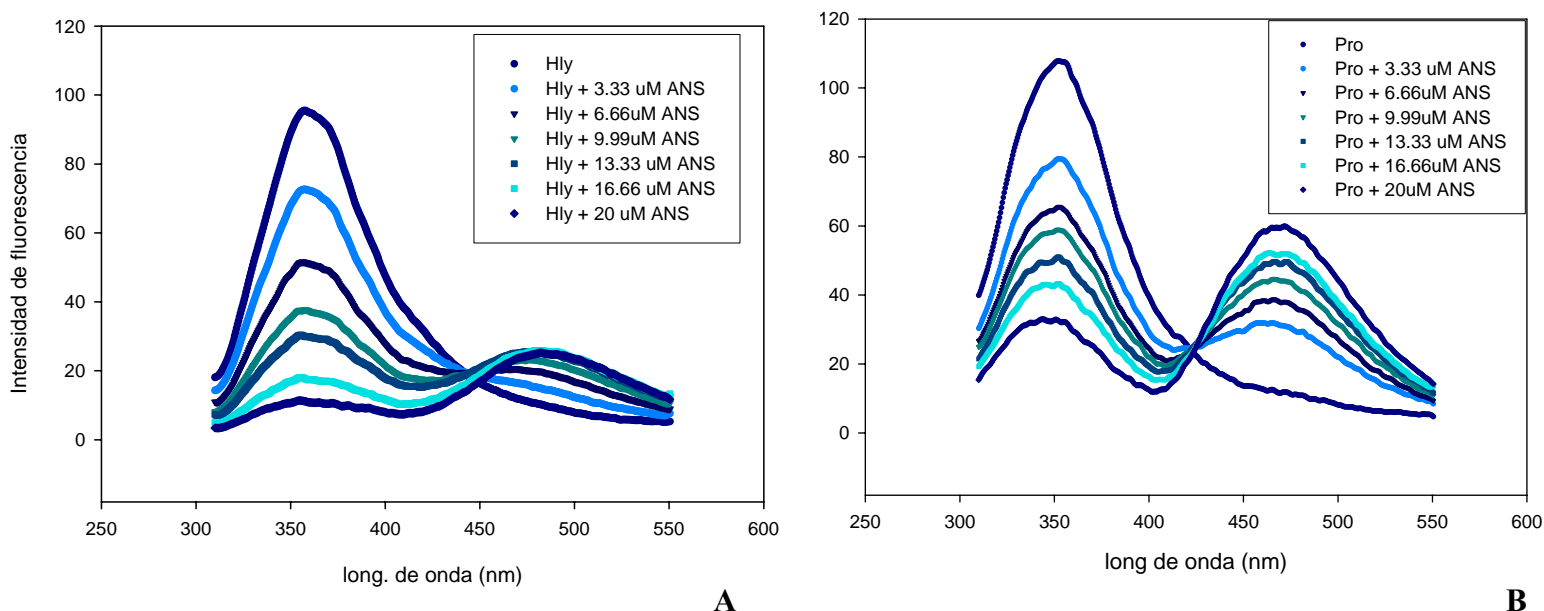


Fig VA.7: Espectros de emisión del complejo ANS-proteína. Se tituló 10 ug/ml de HlyA (A) y ProHlyA (B) con cantidades crecientes de ANS (0-20 μ M). $\lambda_{Exc}=295$ nm

En las Fig.VA.7 se observa que el agregado de ANS produce el apagamiento de la fluorescencia de los Trp y que un segundo pico de emisión aparece a los 470 nm,

correspondiente al complejo ANS-proteína, indicativo de la transferencia de energía entre los Trp y las moléculas adsorbidas en ambas proteínas. El apagamiento de la fluorescencia de los Trp de HlyA es mayor comparada con ProHlyA debido a la mayor accesibilidad a las moléculas de ANS. Sin embargo, el aumento de fluorescencia de ANS es menor debido a la menor afinidad HlyA-ANS, como lo muestran los valores de K_d . En la Fig.VA.8 se muestra la relación entre la eficiencia de transferencia de energía, calculada como el descenso de la fluorescencia de Trp, y la concentración de ANS.

Fig.VA.8

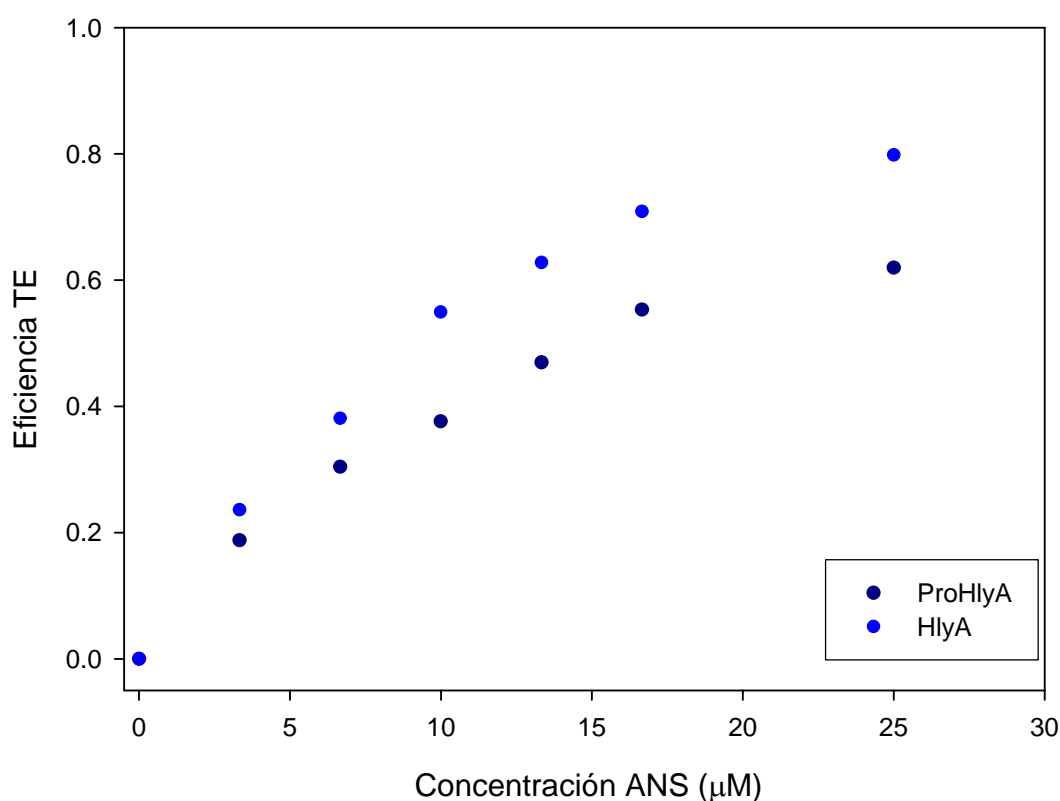


Fig VA.8: Relación de la eficiencia de TE con la concentración de ANS para ProHlyA (●) y HlyA (●).

3A.6 Digestión controlada con tripsina de HlyA y ProHlyA

La digestión controlada de proteínas con proteasas es útil para determinar la flexibilidad o compactación de proteínas. Aquellas que tengan mayor grado de compactación serán más resistentes a la proteólisis (Creighton, 1984). Es mas, proteínas parcialmente estructuradas o desordenadas se pueden caracterizar según su sensibilidad a la proteólisis (Kriwacki et al., 1997). Para comprobar experimentalmente si la

presencia de ácidos grasos aumenta la velocidad de digestión se realizó una digestión controlada de ambas proteínas con tripsina.

Las reacciones de proteólisis se frenaron a distintos tiempos con un inhibidor de tripsina (PMSF) y se analizó la banda de proteína en un gel 10% PAGE-SDS, como se muestra en la Fig.VA.9 A y B.

Fig.VA.9

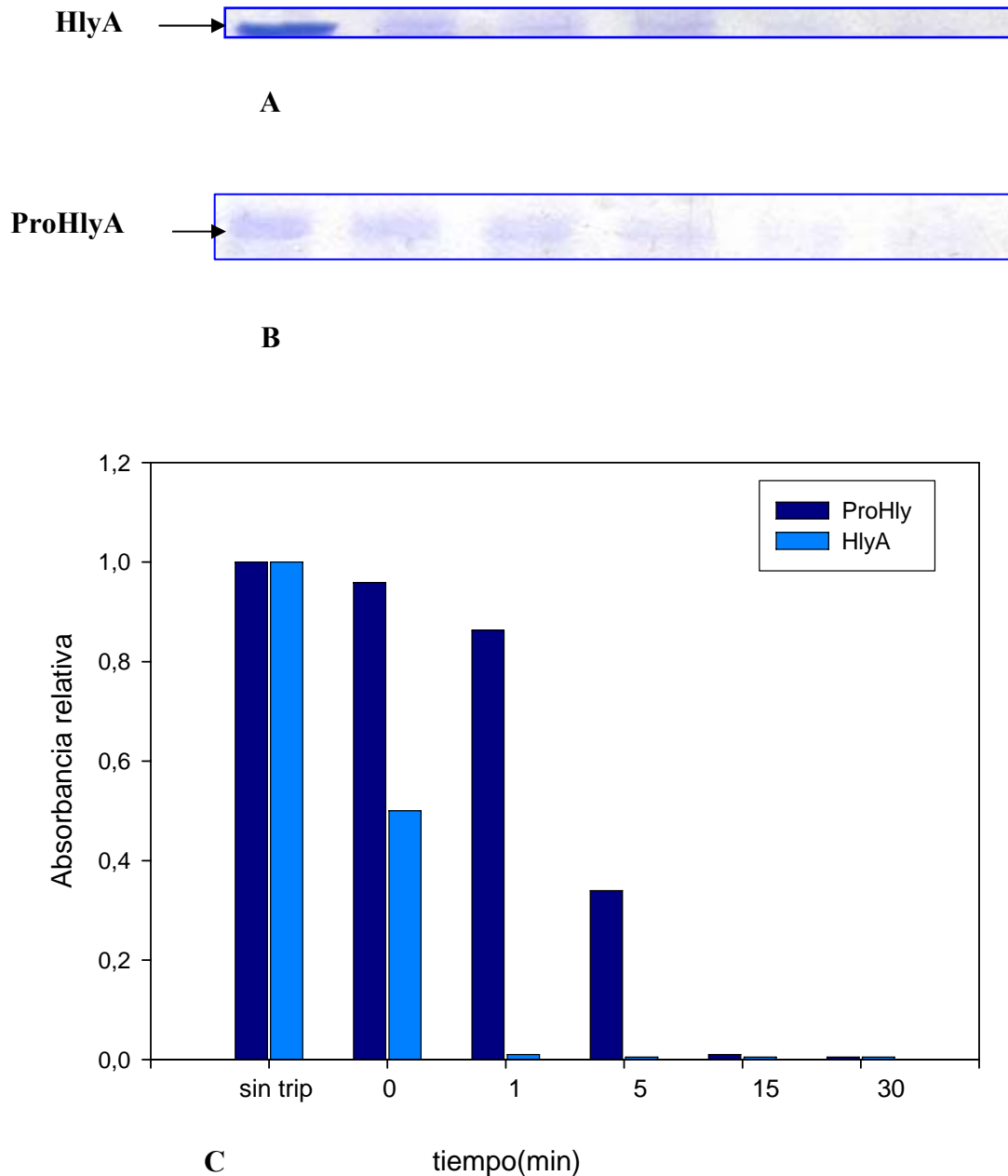


Fig VA.9: Gel 10% PAGE-SDS de proteólisis controlada de HlyA (A) y ProHlyA (B). Se sembró la misma cantidad de proteína en todas las calles. Medida de absorbancia de banda de HlyA y ProHlyA a distintos tiempos, se utilizó el software Kodak Digital Science 1D (C).

En la Fig.VA.9 A se observa que HlyA es digerida por tripsina casi completamente al minuto, mientras que ProHlyA es digerida totalmente después de 15 minutos. Esto demuestra que ProHlyA tiene una estructura mas compacta y que los ácidos grasos presentes en HlyA le producen un cambio conformacional tal que la hacen mas sensible a la proteólisis.

3A.7 Predicción de regiones desordenadas de ProHlyA

Los predictores de desorden de proteínas se basan en la suposición que la ausencia de estructura rígida está codificada en su secuencia de aminoácidos. De hecho, análisis estadísticos muestran que la secuencia de aminoácidos que codifica para proteínas o regiones intrínsecamente desordenadas varían de aquellas ordenadas en su composición, flexibilidad, hidrofobicidad, carga, número de coordinación y demás factores (Dunker et al., 2001). En la Fig.VA.10 se muestra la predicción de desorden de la secuencia de ProHlyA por el predictor PONDR-VSL1.

Fig.VA.10

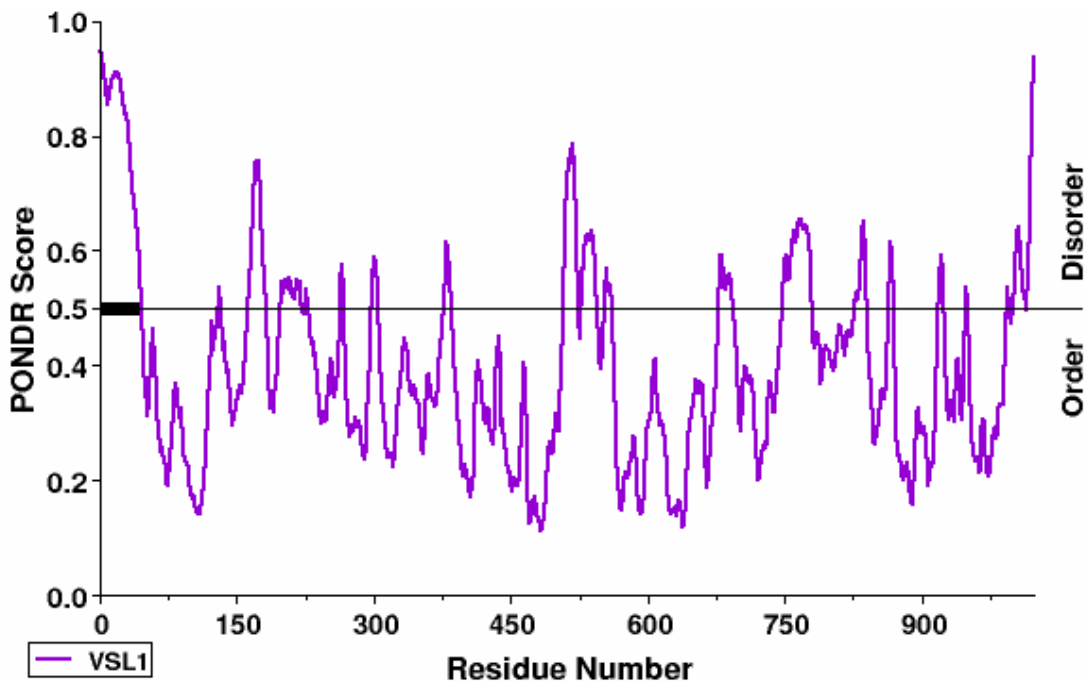


Fig VA.10: Resultados de la predicción PONDR-VSL1 de ProHlyA. En el eje X se grafica el número de aminoácidos de la proteína y en el eje Y la predicción de desorden. Un valor mayor a 0.5 indica que el residuo esta altamente desordenado

Los resultados de predicción muestran la existencia de regiones potencialmente desordenadas en la secuencia de la ProHlyA. Aquellas regiones compuestas por al menos 8 aminoácidos desordenados son: 1-45, 377-385, 508-523, 528-543, 553-561, 678-693, 748-779, 827-839, 1002-1013 y 1015-1023. Es importante destacar que la mayoría de ellas se encuentran en la mitad carboxilo terminal de ProHlyA, región que está involucrada en distintos pasos del mecanismo de acción de HlyA que comprenden desde su reconocimiento por el sistema excretor hasta la formación del poro en las células blanco.

En conclusión estos resultados muestran que HlyA tiene una conformación glóbulo fundido, promovida por la presencia de los ácidos grasos. Este hecho ha sido demostrado por la menor concentración de GnCl necesaria para desnaturalizarla, el alto número de moléculas de ANS que se unen débilmente, la mayor eficiencia de TE entre los Trp y las moléculas de ANS y su mayor rapidez de proteólisis, en comparación con ProHlyA.

Todas las características mencionadas son típicas de proteínas con conformación glóbulo fundido, grupo incluido dentro de la categoría de proteínas intrínsecamente desordenadas (Dunker et al., 2001). Como se presenta en la discusión final estas regiones desordenadas podrían exponerse por la conformación conferida por los ácidos grasos.

Parte B: Rol de los ácidos grasos en la estructura y función de HlyA en membranas

3B.1 Unión de HlyA y ProHlyA a membranas

La interacción de las proteínas con membranas se estudió por cambios en los espectros de emisión de los Trp. En la Fig.VB.1 se muestran los espectros de HlyA (A) y ProHlyA (B) en solución y unidas a LUV de POPC.

Fig.VB.1

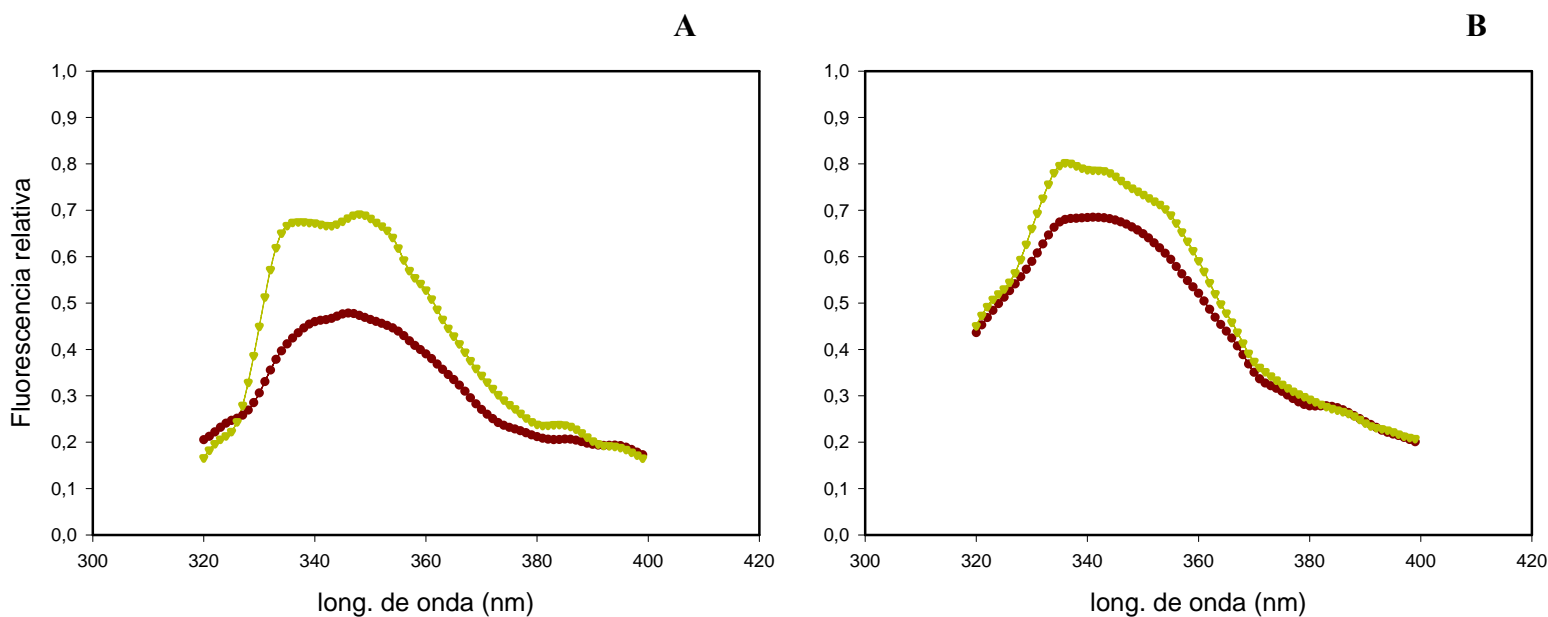


Fig VB.1: Espectro de emisión de fluorescencia de HlyA (A) y ProHlyA (B) en solución (\blacktriangledown) y unidas a LUV POPC (\blacktriangledown). Se agregaron 10 μ g de proteínas a 0.2 mM de lípidos. λ_{exc} = 295 nm.

Como se muestra en la Fig.VB.1.A la unión de HlyA a LUV de POPC produce un aumento en la intensidad de fluorescencia intrínseca de la proteína, y la aparición de dos máximos; uno corrido hacia el rojo (349 nm) sugiriendo una localización interfacial de los Trp en la membrana y otro aparece a 337 nm, desplazado hacia el azul, indicando un entorno no polar para esa población de Trp. Por otro lado en la Fig.VB.1.B se muestra la unión de ProHlyA a LUV, donde también se observa un aumento en la intensidad de fluorescencia, indicando la unión de la misma a la membrana y que al menos algunos de los Trp están parcialmente insertados en la misma. En este caso no se definen dos máximos lo que estaría indicando que el cambio de conformación al unirse a la membrana es diferente.

Del análisis de los espectros se observa un 50% de aumento de fluorescencia por la unión de HlyA a membranas, mientras que para ProHlyA dicho aumento es de sólo 15%.

Este ensayo no hace mas que corroborar por otra técnica que la unión a membranas es independiente de la acilación como lo demostraron otros investigadores (Bauer and Welch, 1996), (Schindel et al., 2001), (Soloaga et al., 1996), pero por lo anteriormente descrito dicha unión debe ser diferente.

3B.2 Cálculo del área ocupada por HlyA y ProHlyA unidas a membranas

Se calculó el área que ocupan las proteínas en la membrana a modo de caracterizar dicha asociación. Para esto se realizaron ensayos donde se agregaron cantidades crecientes de HlyA y ProHlyA a LUV POPC marcados con Rh-PE:NBD-PE en relación 100:0.6:0.6, condición en la cual existe un 100% de eficiencia de TE entre las sondas. En la Fig.VB.2 se muestran los espectros obtenidos.

Fig.VB.2

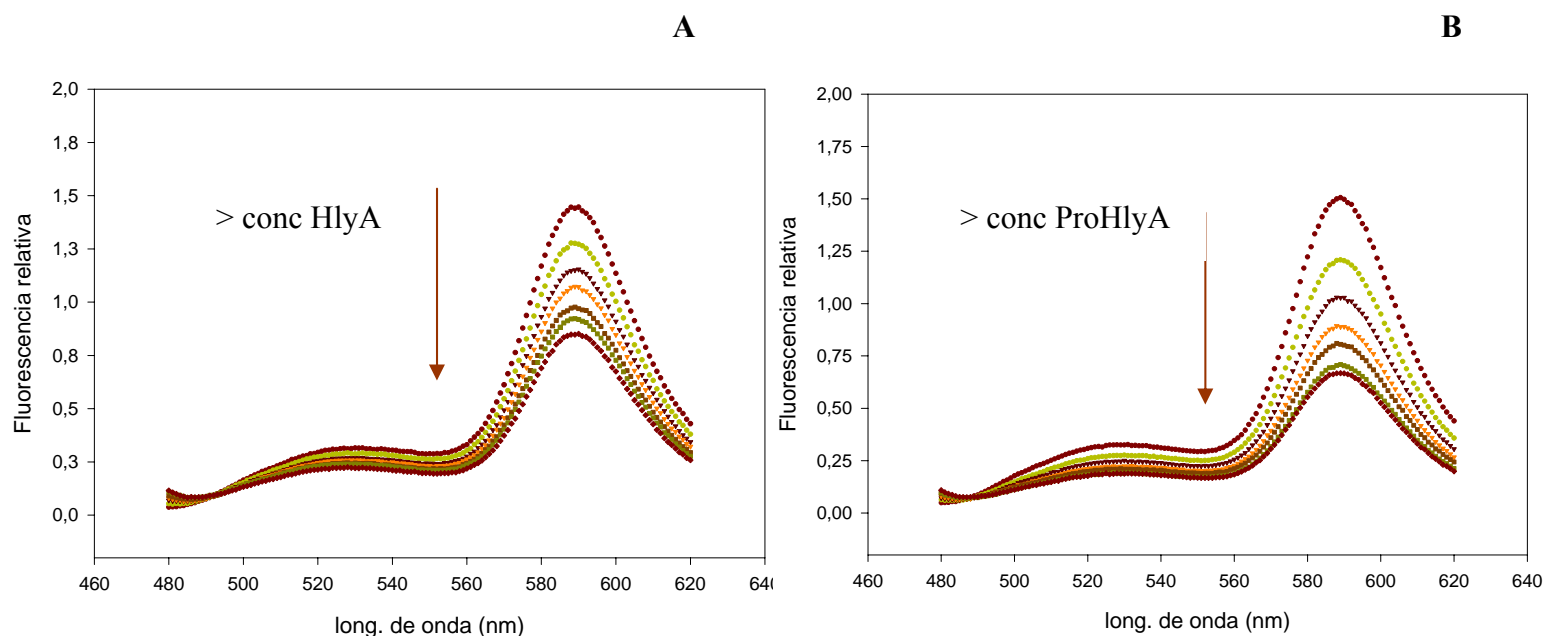


Fig VB.2: Espectro de emisión de fluorescencia de LUV marcados con Rh-PE y NBD-PE (100:0.6:0.6) en presencia de cantidades crecientes desde 0 – 30 ug de HlyA (A) y ProHlyA (B). $\lambda_{exc}=467$ nm. Todos los espectros fueron corregidos por dilución.

Como se observa en la Fig.VB.2 A y B el agregado creciente de proteína produce una separación entre las sondas (Rh-PE y NBD-PE) con la consiguiente disminución de TE, observada como descenso de fluorescencia de la Rh (aceptor). Esto estaría indicando que tanto HlyA como ProHlyA se asocian con la membrana, al igual que encontraron recientemente Sanchez-Magraner *et al.* por estudios en monocapas (Sanchez-Magraner et al., 2006). A partir de los datos de fluorescencia de emisión de Rh de la Fig.VB.2 se calculó la disminución de eficiencia de TE por cada agregado de proteína. Graficando ese valor versus la relación proteína unida/lípido se obtuvo de la pendiente la relación del incremento de área debido a la asociación de una molécula de proteína, comparada con el área que ocupa una molécula de lípido (Fig.VB.3), como lo demuestra la siguiente relación:

$$\Delta E/ E_0 = -\Delta S/ S_0 = -s_p/ s_l * p/l$$

Fig.VB.3

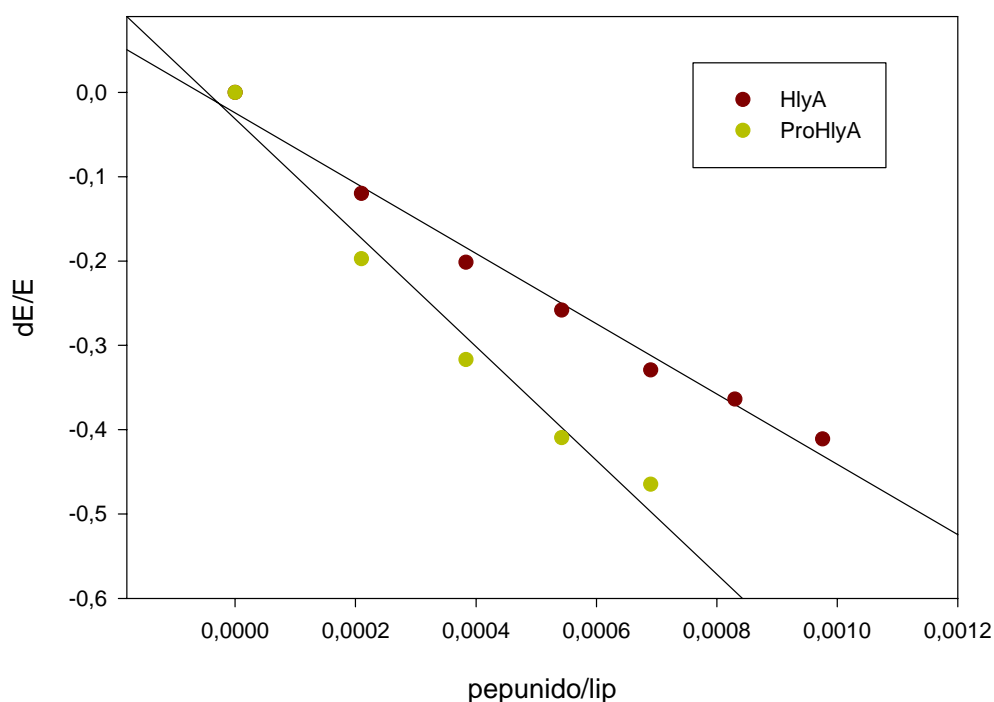


Fig VB.3: Relación entre $\Delta E/ E_0$ vs $p \text{ unido}/l$ para HlyA (●) y ProHlyA (●).

A partir de las pendientes de la Fig.VB.3 se calculó el área de HlyA y ProHlyA multiplicando dichas pendientes por s_1 (s_1 DOPC $\approx 70 \pm 4 \text{ \AA}^2/\text{lípido}$). En la Fig.VB.4 se grafica la relación entre el área que ocupan ambas proteínas.

Fig.VB.4

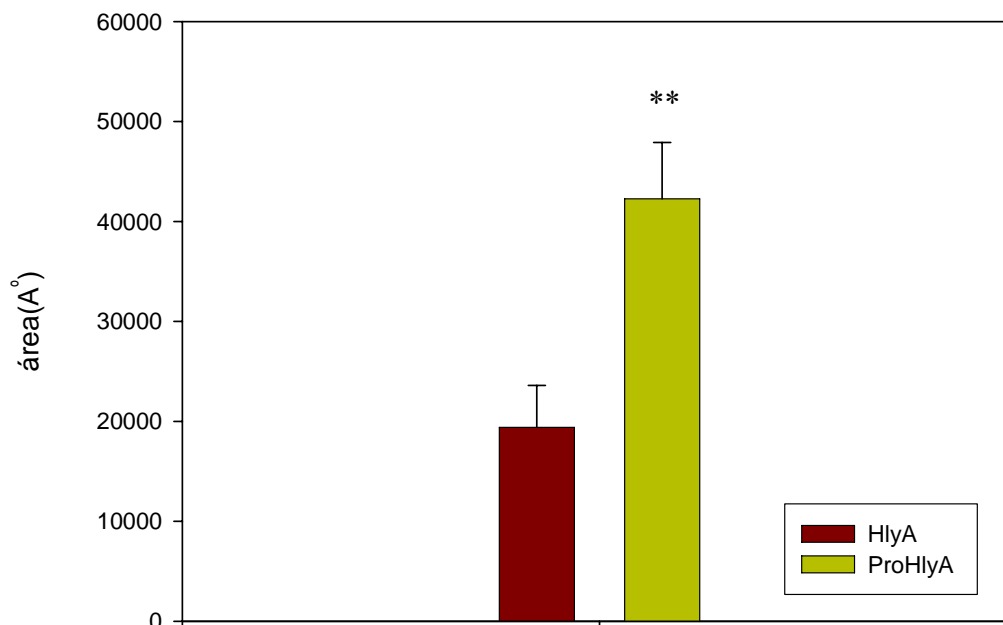


Fig VB.4: Relación de áreas de HlyA (●) y ProHlyA (●). N=4. La diferencia entre ambas áreas es significativa ($p < 0.01$)

Como se muestra en la Fig.VB.4 ProHlyA ocupa el doble del área que ocupa HlyA. Esto se debería a la estructura mas laxa de HlyA que le permite cambiar su conformación al asociarse con membranas y así sufrir una transición conformacional que conduzca a la inserción de la proteína en la bicapa, y como consecuencia de esto último la menor área superficial ocupada.

Soloaga *et al* encontraron que 400 fosfolípidos no son termotrópicamente afectados por la interacción de HlyA con membranas (Soloaga et al., 1999). Si se multiplica este valor por el área que ocupa un fosfolípido daría un valor de 28000 \AA^2 , valor similar al área encontrada para HlyA.

3B.3 Transferencia de HlyA y ProHlyA unidas a MLV POPC hacia LUV de doxilo-POPC

Como se demostró anteriormente, existen al menos dos fases en la interacción con membranas de HlyA: una fase de adsorción pasiva a la superficie y luego una fase

de inserción irreversible a la membrana ((Bakás et al., 1996), (Ostolaza et al., 1997)). Si tanto HlyA como ProHlyA son capaces de unirse a membranas, entonces la razón que explicaría porque ProHlyA no es hemolíticamente activa podría deberse a diferencias en la forma de unión. Para estudiar si los ácidos grasos unidos a HlyA son los responsables de la unión irreversible de la proteína, se realizaron ensayos de transferencia utilizando el método empleado por Bakás *et al* (Bakás et al., 1996). En este caso, los eritrocitos fueron reemplazados por LUV de doxilo-POPC, para evaluar la transferencia, ya que ProHlyA no tiene actividad hemolítica. Brevemente la técnica consiste en unir previamente las proteínas a MLV, separar la proteína libre y enfrentarlos con LUV doxilo-POPC. Si existe transferencia de la proteína desde MLV a los LUV marcados se verá un descenso de la fluorescencia de Trp ya que los doxilos son apagadores de la misma. Esto indicaría que la unión a la membrana de la proteína es reversible. Por el contrario si no existe descenso de la fluorescencia entonces la unión es irreversible.

Fig.VB.5

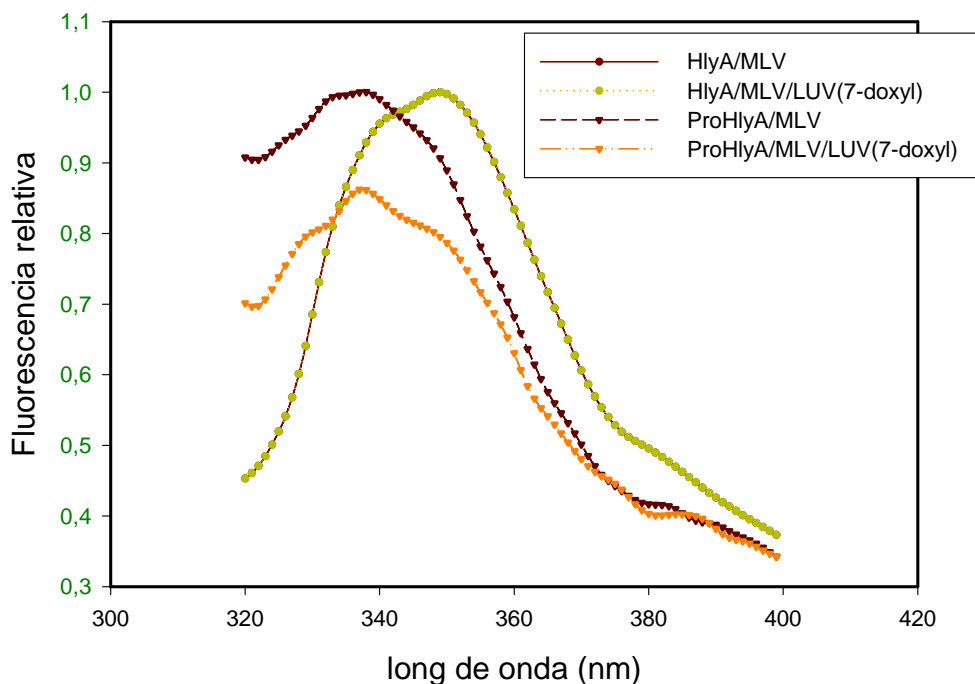


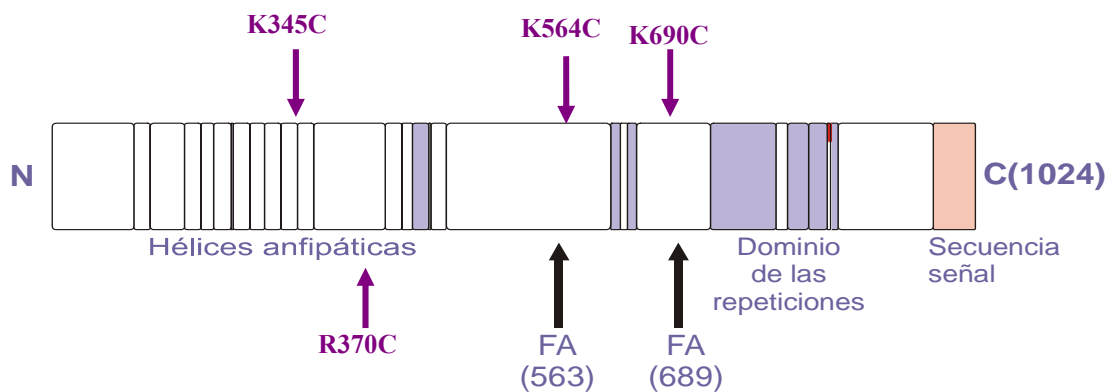
Fig VB.5: Espectro de emisión de fluorescencia de HlyA (●) y ProHlyA (▼) unidos a MLV. Luego estas proteínas unidas se pusieron en contacto con MLV-7 doxilo (HlyA (●) y ProHlyA (▼)). λ_{exc} = 295 nm.

Como se muestra en la Fig.VB.5 sólo en el caso de ProHlyA se observa un descenso de la fluorescencia de los Trp, sugiriendo que la proteína no acilada se une reversiblemente a membranas y así puede transferirse a LUV que contiene doxilos. Por el contrario en el caso de HlyA no se registró transferencia de la misma ya que los espectros de fluorescencia con y sin LUV doxilo-POPC se solapan perfectamente. Por lo tanto los ácidos grasos están involucrados en la unión irreversible de HlyA a la membrana.

3B.4 Purificación de los mutantes de cisteína

Con la finalidad de determinar si HlyA oligomeriza en la membrana se marcó la toxina con fluoresceína y rodamina que se unen covalentemente a ϵ amino de residuos de Lys para estudiar dicho proceso por TE. Dado el alto número de residuos de Lys, o la alta afinidad que presentan estos fluoróforos por regiones hidrofóbicas, la eficiencia de marcado obtenida era alta y esto condujo a una inactivación de la proteína. Entonces se utilizaron mutantes de HlyA donde un residuo específico se mutó por mutagenesis dirigida a Cys (residuo ausente en la proteína) y se marcó con sondas que se unen a grupos sulfhidrilo.

En el siguiente esquema de la proteína se muestra la localización de los aminoácidos mutados a Cys.



Los distintos mutantes purificados muestran sólo un 10% de impurezas, como se muestra en la Fig.VB.6.

Fig.VB.6

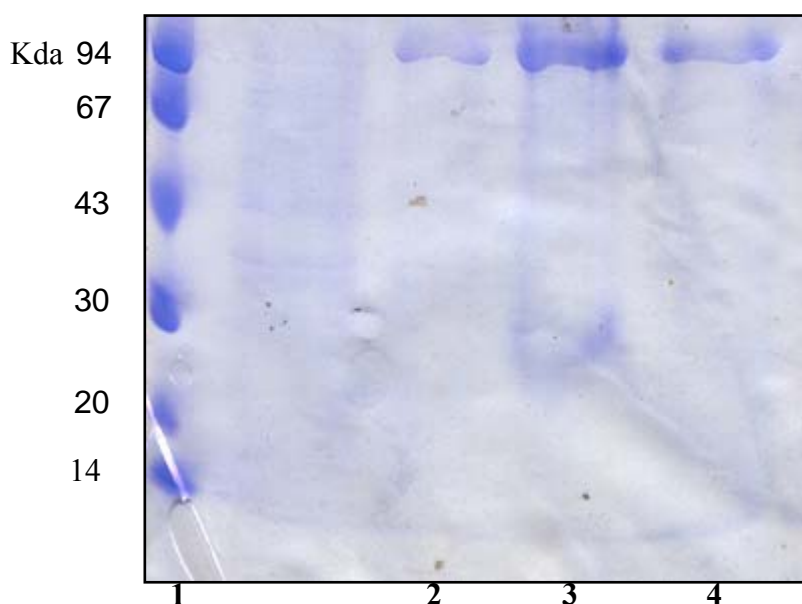


Fig VB.6: Gel 10% PAGE-SDS de la purificación de los mutantes de cisteína, teñidos por Comassie Blue. Calle 1 : LMW, 2 : mut K564C, 3: R370C, 4: K344C

3B.5 Medida de transferencia de energía de los distintos mutantes de cisteína de HlyA para estudiar el proceso de oligomerización

Para este ensayo se utilizaron los siguientes mutantes de cisteína:

- K345C
- R370C
- K564C
- K690C

Se eligieron los anteriores mutantes porque los dos primeros están ubicados en la región de inserción de la proteína a la membrana (177-411) (Hyland et al., 2001) y probable región involucrada en la formación del poro, ya que mutaciones que alteran la característica hidrofóbica de esa región, reducen o inhiben la actividad formadora de poros en eritrocitos y liposomas (Ludwig et al., 1991). Los dos últimos corresponden a los dos sitios de acilación de la proteína y fueron elegidos para estudiar el rol de los ácidos grasos en el proceso de oligomerización.

Se marcaron los mutantes con Alexa-488 (donor), derivado hidrofílico de fluoresceína (F) y Alexa-546 (aceptor), derivado de rodamina (R). El proceso de

marcado no alteró la actividad hemolítica. Se marcó también la proteína salvaje como control de marcado inespecífico, ya que esta proteína no contiene Cys, detectándose un bajo grado de marcado.

En la Fig.VB.7 se muestra un ejemplo de espectros donde se observa TE (A) y un ejemplo donde no se observa TE (B).

Fig.VB.8

A

B

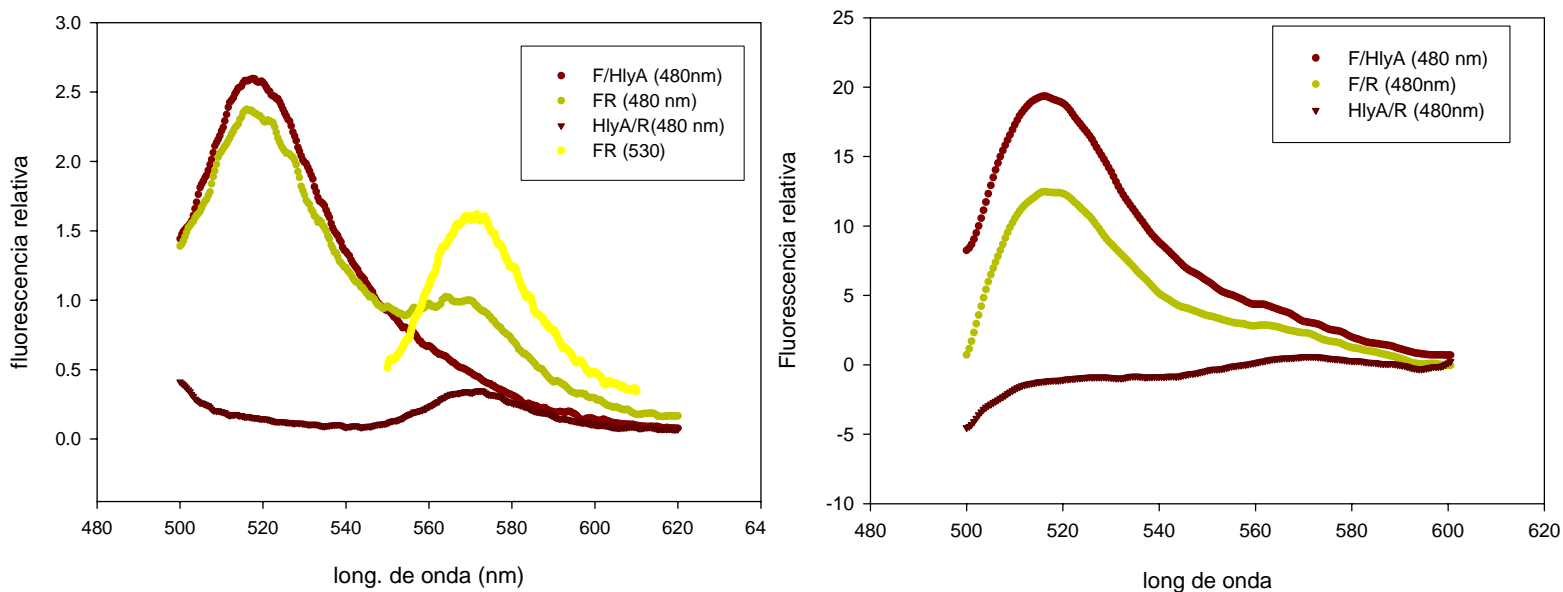


Fig VB.8: Espectros para mutante K564C (A) y para mutante K690C (B). λ_{exc} = 480 nm o 530 nm, según se indique.

En la Fig.VB.7.A se muestra claramente el descenso de fluorescencia de F, mientras que la fluorescencia de R aumenta debido a la transferencia de energía desde F a R. Este efecto se debe a que ambas sondas se encuentran dentro de la distancia de Forster (57 \AA), que solamente se puede observar si HlyA oligomeriza sobre la membrana del eritrocito de carnero. Por el contrario en la Fig.VB.7.B no se observa TE.

A partir de los datos de fluorescencia de estos espectros se calculó la eficiencia de TE como aumento de fluorescencia del aceptor (R) para los distintos mutantes.

Fig.VB.8

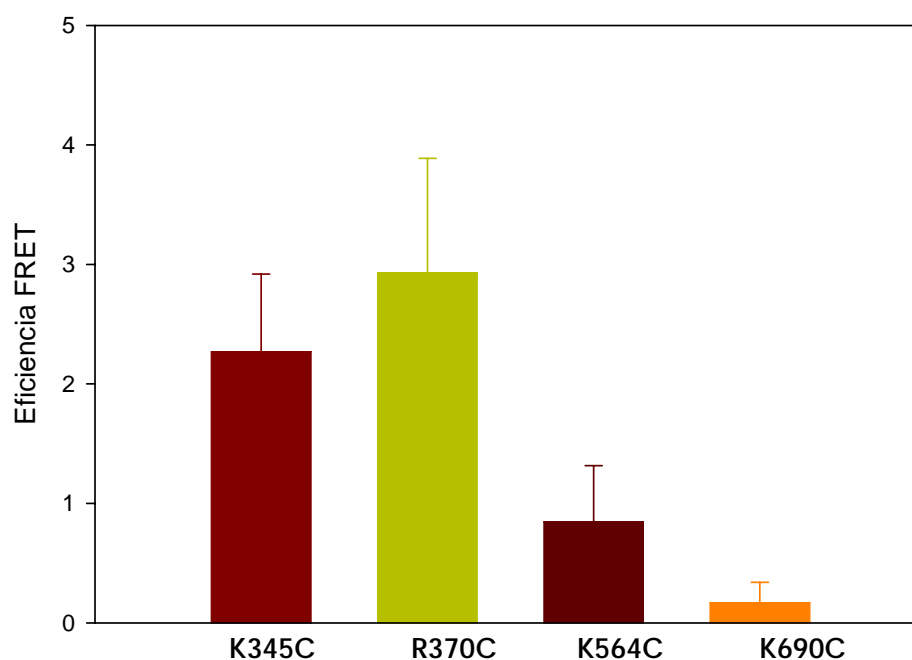


Fig VB.9: Eficiencia de FRET como aumento de fluorescencia del aceptor para los mutantes K345C (■), R370C (■), K564C (■) y K690C (■). N=3

En la Fig.VB.8 se observa una mayor eficiencia de TE en los mutantes donde la Cys están ubicadas en la región de inserción de la proteína (K345C y R370C). Esto indica que HlyA oligomeriza cuando se une a membranas. Los dos mutantes de cisteína de los sitios de acilación presentan baja eficiencia TE, indicando que los ácidos grasos están involucrados en el proceso de oligomerización, o que la distancia entre las sondas unidas en esa región es mayor al radio de Förster, y por eso presenta una baja eficiencia de TE. Para corroborar si efectivamente los ácidos grasos están involucrados en la oligomerización se preparó el mutante PRO 345, que se trata de ProHlyA con la mutación K345C, se marcó la proteína con las dos sondas y se realizó la interacción de la misma con membranas como se realizó con los mutantes anteriores. En la Fig.VB.9 se muestra los datos de eficiencia de TE para los mutantes HlyA K345C y ProHlyA K345C.

Fig.VB.9

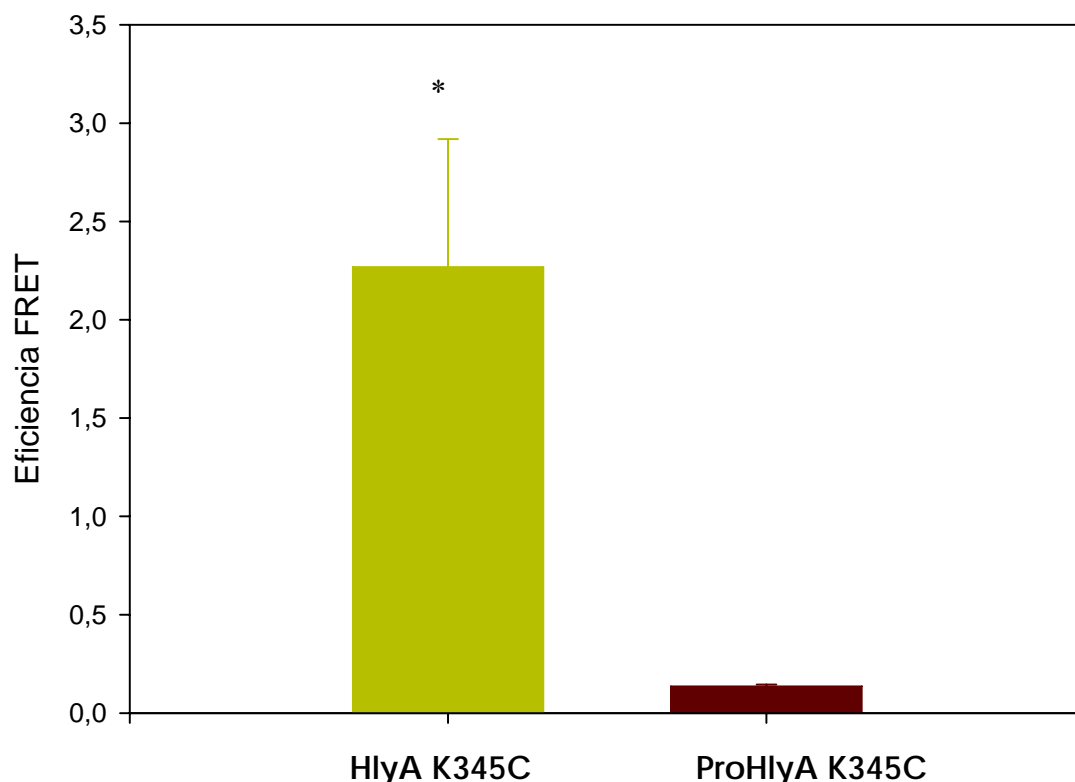


Fig VB.9: Eficiencia de FRET como aumento de fluorescencia del aceptor para los mutantes HlyA K345C (■) y ProHlyA K345C (■). N=3 (p=0.03)

Como se había observado en la Fig.VB.8 HlyA K345C presenta TE, mientras que el mutante análogo de ProHlyA no presenta TE (Fig.VB.9). Esto indica que los ácidos grasos están involucrados en el proceso de oligomerización.

3B.6 Influencia de los raft en el proceso de oligomerización

Ciertas clases de proteínas son secuestradas dentro de pequeños compartimentos de membranas o microdominios llamados lipid-raft, favoreciendo de esta manera interacciones proteína-proteína y activando la transducción de señales y reacciones enzimáticas. Algunos receptores de toxinas también se concentran en estos dominios, promoviendo procesos de multimerización. Estos microdominios están enriquecidos en esfingolípidos y colesterol junto a proteínas específicas.

Para estudiar la influencia de los rafts en el proceso de oligomerización se realizaron los experimentos de TE pero se utilizaron fantasmas de eritrocitos de carnero tratados con metil β ciclodextrina. Este compuesto es capaz de extraer colesterol y por lo tanto de desestabilizar los rafts (Vazquez et al., 2002). El contenido de colesterol de los fantasmas tratados con metil β ciclodextrina fue de 30 % menos con respecto a los fantasmas sin tratar. A continuación se muestra la relación de eficiencia de TE del mutante R370C en fantasmas de eritrocitos de carnero tratados y no con metil β ciclodextrina.

Fig.VB.10

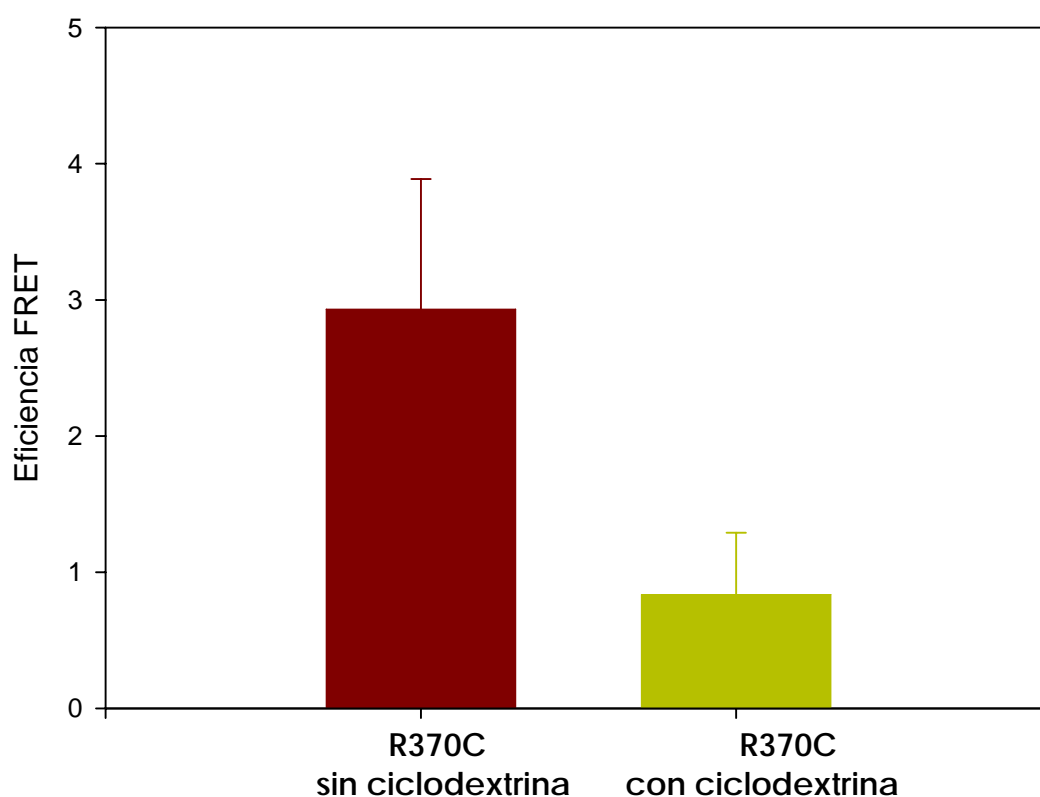


Fig VB.10: Eficiencia de FRET como aumento de fluorescencia del aceptor para HlyA R370C en fantasmas de glóbulos de carnero sin tratar con ciclodextrina (■) y tratados con ciclodextrina (■). N=3

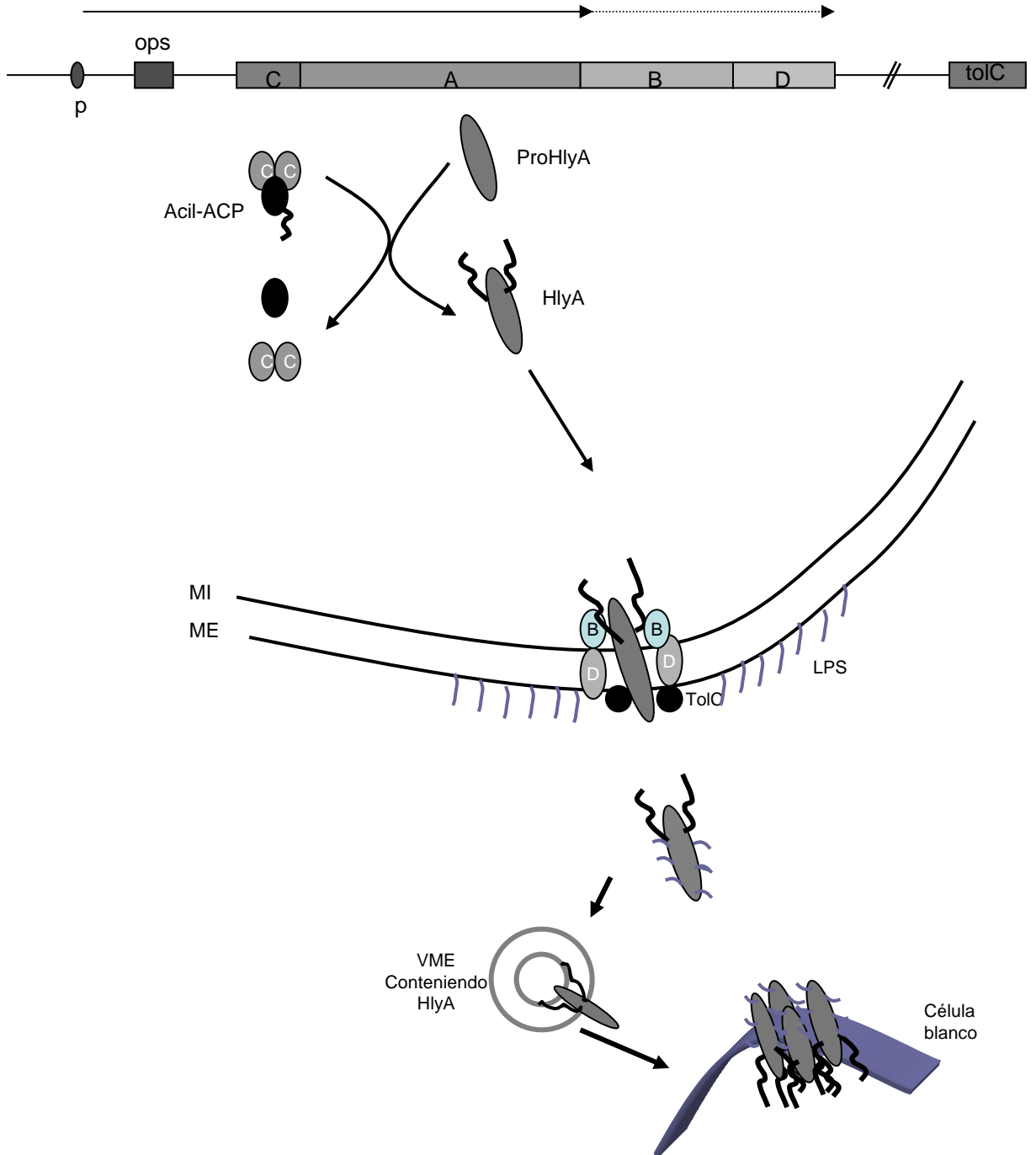
En la Fig.VB.12 se muestra la influencia de los raft en el proceso de oligomerización, ya que existe una reducción de más del 50% de la eficiencia de TE luego del tratamiento con ciclodextrina.

Con la finalidad de cuantificar el número de monómeros que forman el oligómero, se realizaron ensayos usando BS³(bis(sulfosuccinimidyl) suberato) y sulfo EGS (etilen glicolbis (sulfosuccinimidilsuccinato)) como reactivos de entrecruzamiento

de HlyA y ProHlyA unidas a fantasmas de eritrocitos. Se trató de detectar esta estructura oligomérica empleando distintas técnicas como: geles SDS-PAGE continuos y discontinuos de distinto porcentaje de acrilamida, Western Blot, geles de agarosa y cromatografía de exclusión molecular. Por ninguna de estas técnicas se observó una estructura definida del oligómero. Este resultado indicaría que la estructura responsable de la lisis es un poro dinámico, el cual aumenta de tamaño en función de la temperatura, concentración y tiempo de exposición de la toxina a las membranas (Moayeri and Welch, 1994). Y como el objetivo de este ensayo era cuantificar la cantidad de monómeros que forman el poro a concentraciones líticas, se utilizó una relación proteína-lípido alta. Probablemente a esta concentración se forma un poro con un número elevado de monómeros que al entrecruzarse forman estructuras grandes, imposible de ser detectadas por los métodos anteriormente mencionados. Por otro lado, las reacciones de entrecruzamiento se realizaron durante dos horas, otro factor que contribuye al aumento del tamaño del poro y por lo tanto al número de monómeros que lo forman.

En conclusión los ácidos grasos unidos covalentemente a la toxina no contribuyen a la unión de la misma a membranas, pero estos sí contribuyen a que la proteína se una con una conformación específica haciendo esa unión irreversible. Además estos ácidos grasos contribuyen a las interacciones proteína-proteína para formar una estructura oligomérica dinámica en la membrana. El ácido graso K690 parecería ser indispensable para estas funciones, ya que el mutante K690C es el único que no presenta actividad hemolítica ni oligomeriza en la membrana. Por otro lado los microdominios (rafts) de la membrana facilitan este proceso.

Discusión Final



Discusión final

HlyA es una toxina proteica de 110 kDa secretada al medio extracelular por cepas patógenas de *Escherichia coli*, que actúa sobre eritrocitos y otras células del sistema inmune del hospedador (Lally et al., 1999). Es un factor de virulencia en varias enfermedades extraintestinales como infecciones urogenitales, meningitis y septicemia (Welch et al., 1981). Recientemente se la ha asociado también a enfermedades crónicas intestinales como Enfermedad de Crohn (Darfeuille-Michaud et al., 1998). El estudio de esta toxina es interesante no sólo desde el punto de vista básico para conocer su mecanismo de acción, sino por sus potenciales aplicaciones en biotecnología y en medicina, ya que por su incorporación a células cancerosas, éstas pueden incrementar su susceptibilidad a quimioterápicos o ser destruidas específicamente (Yang.W.S. et al., 2006). Por otro lado, la toxina se puede incorporar en liposomas para que éstos funcionen como sistema de liberación controlada de drogas. Además se ha estudiado su sistema de secreción (tipo I) como un efectivo sistema de presentación de antígenos para vacunas de bacterias vivas atenuadas ((Gentshev et al., 2002), (Dietrich et al., 2003)). Recientemente se ha demostrado que este sistema de secreción de HlyA es totalmente funcional en un amplio rango de bacterias Gram-negativas favoreciendo la secreción de antígenos heterólogos por parte de estas bacterias, presentando el antígeno tanto por MHC tipo I o II y generando así distintas repuestas inmune contra el mismo antígeno((Gentshev et al., 1996), (Spreng et al., 1999)).

Para poder explotar biotecnológicamente esta toxina, primero hay muchos puntos en su mecanismo de acción que hay que dilucidar. En esta tesis se han estudiado distintos aspectos estructurales y funcionales de HlyA asociada al LPS y a vesículas de membrana externa, que actúan como un mecanismo alternativo de secreción. Por otro lado, al ser la acilación interna de HlyA una característica única en proteínas procarióticas, se estudió el rol que cumplen esos ácidos grasos unidos covalentemente a la toxina tanto en solución como en el mecanismo de unión a membranas.

Estudios previos sugieren una conexión entre HlyA y LPS. Las actividades hemolíticas y citotóxicas de la toxina son termolábiles, indicando que el LPS no es directamente el responsable de las diferentes actividades que ésta presenta, pero si pueden actuar cooperativamente, sobre todo a concentraciones sublétricas, donde células expuestas a HlyA inducen la exposición de receptores para LPS (CD14) (Walev et al., 1996). Esta inducción por parte de la célula huésped no es un mecanismo de evasión a

la muerte celular, sino de hacerlo de una manera alternativa, como es la apoptosis y así evitar la lisis.

Por otro lado, HlyA producida por bacterias que contienen LPS-rugoso tienen la actividad lítica disminuida pero su expresión no se modifica, comparada con una cepa que presenta LPS-liso ((Bauer and Welch, 1997), (Standley et al., 1993), (Wandersman and Letouffe, 1993)). Otros estudios mostraron que las fracciones hemolíticamente activas purificadas por cromatografía de afinidad a partir de sobrenadantes de cultivos de cepas productoras de HlyA, reaccionan tanto con anticuerpos monoclonales anti-HlyA, como con anticuerpos anti-LPS, sugiriendo que las dos toxinas pueden existir en forma de complejo ((Bohach and Snyder, 1985), (Bohach and Snyder, 1986)). Dada la relación funcional existente entre HlyA y LPS en esta tesis se estudiaron los cambios estructurales que el LPS induce en la toxina.

Primero se puso apunto el método de purificación de la toxina sin LPS, ya que los métodos tradicionales de purificación como ser cromatografía de exclusión molecular, no rompen la interacción proteína-LPS. Con este propósito, se desnaturalizó la toxina por calentamiento en presencia de SDS y se separaron ambas moléculas por electroforesis preparativa. Finalmente se recuperó la proteína activa precipitando el SDS con KCl. Como se mostró en la Fig.III.2 y tabla III.1 I los contenidos de LPS en esas muestras eran despreciables, y por lo tanto se la utilizó en los ensayos realizados posteriormente.

En cuanto a los efectos que produce la unión de LPS a la toxina, en el capítulo III se mostró que el LPS le otorga a HlyA tanto estabilidad térmica como química (Fig.III.4). Las medidas de fluorescencia de los Trp de la proteína, muestran un entorno de los mismos mas hidrofóbico para HlyA asociada a LPS, sugiriendo una interacción específica entre ambos, ya que la conformación estudiada de esta manera se recupera al reconstituir el complejo HlyA-LPS (Fig.III.3). Esta interacción evita la agregación irreversible de HlyA (Fig.III.5) y favorece su actividad hemolítica a menores concentraciones de calcio (Fig.III.6). Esto se debería a la presencia de cargas negativas en la molécula de LPS que actúan como reservorio de calcio, aumentando así la concentración local de dicho catión. Por otro lado, la presencia del LPS al disminuir la formación de agregados irreversibles de la proteína, aumentaría en solución la cantidad de monómero, considerada la especie hemolíticamente activa en solución (Soloaga et al., 1998).

En el capítulo IV se estudió la secreción al medio de HlyA asociada a vesículas de membrana externa por parte de la cepa WAM 1824 de *E.coli*. (Fig.IV.2 y Fig.IV.5), ya que se sabe que muchas bacterias Gram-negativas secretan factores de virulencia al medio a través de estas vesículas (Beveridge, 1999). En simultáneo con este estudio otro grupo de investigación publicó un trabajo donde también encontraron que HlyA se asocia a vesículas secretadas por distintas cepas de *E.coli* (Balsalobre et al., 2006). La tabla IV.1 muestra que estas vesículas son hemolíticamente activas y que HlyA es la única proteína responsable de dicha actividad. En la Fig.IV.9 se observa que la toxina asociada a las vesículas mantiene la eficiencia y especificidad contra eritrocitos de distintas especies (caballo y conejo) comparada con la toxina libre, presentando mayor actividad específica (tabla IV.2). Esto indicaría que HlyA se encuentra concentrada en las vesículas. El mecanismo hemolítico de la toxina secretada de esta forma también se mantiene, ya que como muestran la Fig.IV.8 y la tabla.IV.2 existe una transferencia desde estas vesículas a los eritrocitos, sin mediar procesos de fusión. Probablemente esta transferencia esté favorecida por la unión con mayor afinidad de HlyA a algún receptor presente en los eritrocitos. Estos resultados se ven reforzados por los encontrados por Balsalobre *et al.* quienes mostraron que HlyA sólo se disocia de VME en presencia de detergentes (Balsalobre et al., 2006).

Entonces desde el punto de vista funcional cual sería la ventaja de la liberación de la toxina de esta forma? Para esto se analizó la cinética de hemólisis de HlyA libre y asociada a vesículas (HlyA-VME) (Fig.IV.10). Se encontró que para ambas muestras el tiempo necesario para alcanzar un 50% de hemólisis aumenta a medida que disminuye la concentración, pero el tiempo lag es mayor a medida que disminuye la cantidad de HlyA-VME, manteniéndose constante con la concentración de HlyA libre. Mientras que la velocidad inicial de hemólisis se mantiene prácticamente constante para las diferentes concentraciones de HlyA-VME ensayadas, estas velocidades disminuyen con la disminución de la concentración de HlyA libre. Por lo tanto se puede concluir que el paso limitante en el proceso de hemólisis para HlyA-VME es la difusión en el medio acuoso hasta el eritrocito. Una vez que lo alcanzan muchas moléculas de toxinas concentradas en las vesículas son transferidas. Por el contrario, el paso limitante para HlyA libre es el número de toxinas que alcanzan el eritrocito para destruirlo, como lo demuestra el descenso de la velocidad inicial con la concentración de toxina. Además

del incremento de la concentración local de la toxina en las VME, otra ventaja sería la de estar protegido de proteasas presentes en el hésped.

En el capítulo V se estudió el rol de los ácidos grasos en la estructura y función de HlyA. Como se explicó anteriormente HlyA se sintetiza en forma de protoxina, ProHlyA, la cual es activada intracelularmente por la cosintetizada HlyC. Esta activación consiste en la unión covalente de dos ácidos grasos, principalmente mirístico, a dos residuos internos de lisina, K564 y K690. Si bien el mecanismo de acilación como mecanismo de activación es común para muchas proteínas eucarióticas y procarióticas, el tipo de unión covalente estable en dos residuos internos de lisina es un evento único en las toxinas pertenecientes al grupo RTX. Por eso planteamos la hipótesis, que implicancias tienen los ácidos grasos en el mecanismo de acción de la toxina. Para esto se dividió el estudio en dos partes; una primera parte donde se estudió los cambios conformacionales que le inducen a la proteína en solución; y una segunda parte donde se estudió el rol de los mismos en el mecanismo de unión a membranas.

Los resultados muestran que los ácidos grasos unidos covalentemente a HlyA le confieren una conformación glóbulo fundido a la proteína. Este hecho ha sido demostrado por la menor concentración de GnCl necesaria para desnaturalizarla (Fig.VA.2), el alto número de moléculas de ANS que se unen débilmente (Fig.VA.5) y la mayor eficiencia de TE entre los Trp y éstas moléculas de ANS (Fig.VA.8) y su mayor rapidez de proteólisis (Fig.VA.9); cuando se la comparó con ProHlyA.

Todas estas características son típicas de proteínas con conformación glóbulo fundido, que se incluyen dentro de la categoría de proteínas intrínsecamente desordenadas (Dunker et al., 2001). Utilizando el predictor VSL1, ProHlyA mostró algunas regiones altamente desordenadas ubicadas principalmente en el extremo C-terminal (Fig.V.10). Estas regiones cumplen diversas funciones:

- En los últimos 50-60 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de HlyA se encuentra el péptido señal para su exportación por el sistema HlyB-HlyD y TolC (Jarchau et al., 1994). Como se observa en la Fig.VA.10 esta región está intrínsecamente desordenada. Anteriormente ya se había demostrado que esta región carecía de una estructura secundaria o terciaria definida (Forestier and Welch, 1991). Aunque se ha publicado que la exportación es independiente de la acilación (Ludwig et al., 1987), los rendimientos de exportación son menores para ProHlyA, habiéndose encontrado una alta concentración de la misma en cuerpos de inclusión, por lo que los

ácidos grasos unidos covalentemente podrían exponer este segmento y así facilitar la exportación de la toxina.

- Se han realizados muchos estudios acerca de la presencia de un receptor para HlyA. Por ejemplo, CD11a y CD18, las dos subunidades de β_2 integrina se identificaron como receptores de HlyA en células humanas HL60 (Lally et al., 1997). Si bien no se ha identificado el dominio que participa de esta interacción, estudios realizados con Adenilato ciclasa- Hemolisina de *Bordetella pertusis* (CyaA), otro miembro de la familia de toxinas RTX, mostraron que el dominio de interacción de CyaA con una integrina se ubica en la región de las repeticiones rica en Gly/Asp (Azami-El-Idrissi et al., 2003). Este dominio es característico de todas las toxinas RTX y está involucrado en la unión con calcio. Ellos proponen que CyaA cambia de una estructura desordenada a α -hélice por unión de calcio. Por este motivo se puede especular que el dominio de unión a calcio, región 550-850 en HlyA, podría estar involucrada en la unión con β_2 integrina. Es importante marcar que esta región también se encuentra intrínsecamente desordenada y que los ácidos grasos podrían estar involucrados en su exposición, ya que la capacidad de unión de calcio de ProHlyA es menor (Soloaga et al., 1996).
- Otra proteína identificada como receptor para HlyA en glóbulos rojos de caballo, es la glicoproteína glicoforina (Cortajarena et al., 2001). Se ha identificado la región 914-936 como el sitio de unión a este receptor (Cortajarena et al., 2003). Como muestra la Fig.VA.10 esta región también se predice como intrínsecamente desordenada.
- Estudios recientes con α -hemolisina de *Staphylococcus aureus* demostraron que las cabezas polares, fosfocolina, de la esfingomiélin, concentrada en los dominios enriquecidos de la misma con colesterol, actúan como receptores de alta afinidad; favoreciendo la oligomerización de la toxina para la formación del poro lítico en las membranas de los eritrocitos de conejo (Valeva et al., 2006). El sitio de unión a la fosfocolina está localizado en la hendidura ubicada entre los residuos W179 y R200 de la toxina. Un sitio de unión similar se encontró para la leukocidina Luk (Kaneko and Kamio, 2004). En HlyA se encuentran dos residuos similares a los anteriores ubicados en W914 y R936, también localizados en una región de desorden. Esto probablemente pueda explicar la alta sensibilidad que tiene los eritrocitos de conejo (Rennie and Arbuthnott, 1974) que carecen de glicoforina (Ligi et al., 1998).

La hipótesis de que los ácidos grasos unidos covalentemente exponen estas regiones de desorden está fuertemente apoyada por la reactividad diferencial de HlyA y

ProHlyA con el anticuerpo monoclonal D12, resultados publicados por Pellet *et al.* Este anticuerpo reacciona con un epítopo localizado entre los residuos 674 -726, y lo interesante es que reacciona sólo con HlyA pero no con ProHlyA, por lo tanto la acilación de la proteína está directamente relacionada con la exposición de dicha región (Pellett *et al.*, 1990). En la Fig.VA.10 esta región se muestra desordenada.

Dado que las proteínas intrínsecamente desordenadas se pueden unir a diferentes estructuras en un proceso denominado "unión promiscua", esto explicaría la sensibilidad a HlyA de un amplio rango celular de diferentes especies. La falta de una estructura rígida le da la posibilidad de unirse con diferentes conformaciones a diferentes células blanco. De allí la diversidad de resultados que se han publicado acerca de la existencia o no de un receptor para HlyA (Lally *et al.*, 1997), (Cortajarena *et al.*, 2001), (Valeva *et al.*, 2005).

En conclusión, los ácidos grasos unidos a HlyA inducen una conformación del tipo glóbulo fundido cuando la proteína se encuentra en solución, exponiendo sitios intrínsecamente desordenados que estarían implicados en distintos pasos de su mecanismo de acción. A continuación se planteó resolver si estos cambios conformacionales que inducen los ácidos grasos tienen alguna implicancia en la unión a membranas de HlyA.

Al igual que otros grupos de investigación (Bauer and Welch, 1996), (Schindel *et al.*, 2001), (Soloaga *et al.*, 1996), en el capítulo V se mostró que la unión de HlyA a membranas es independiente de la acilación, indicando que la hidrofobicidad que pueden aportar los ácidos grasos a la proteína no es necesaria para que se produzca la unión. Parecería ser que ProHlyA se une de manera diferente que HlyA, como lo muestran los espectros de fluorescencia de la Fig.VB.1, donde no aparecen dos máximos bien definidos para ProHlyA como ocurre para HlyA. Como existen al menos dos fases en la interacción de HlyA con membranas: una fase de adsorción reversible a la superficie y luego una fase de inserción irreversible en la matriz hidrofóbica ((Bakás *et al.*, 1996), (Ostolaza *et al.*, 1997)), se concluyó a partir de los resultados de la Fig.VB.5 que los ácidos grasos están implicados en la unión irreversible de toxina. Al unirse ProHlyA a las membranas ocupa el doble del área que ocupa HlyA (Fig.VB.4), apoyando la idea que los ácidos grasos le otorgan la conformación adecuada para la

inserción irreversible. A partir de esto nos planteamos si la irreversibilidad en la unión esta asociada con un evento de oligomerización.

Los ensayos de TE de la Fig.VB.8 muestran que HlyA oligomeriza cuando se encuentra unida a membranas de eritrocitos. En este ensayo se utilizaron mutantes de Cys marcados covalentemente con sondas fluorescentes. Los mutantes K345C y K370R, son los que presentan mayor eficiencia de TE. Esto indica que esta región podría ser la que está directamente implicada en la interacción entre monómeros, si se tiene en cuenta que esta es una región altamente conservada entre las toxinas RTX ((Bellalou et al., 1990), (Cruz et al., 1990)) y que la delección de esta región inhibe la actividad formadora de poros (Ludwig et al., 1991). El cálculo de la distancia a la que se encuentran estas dos sondas, parámetro necesario para determinar el número de monómeros que pueden estar involucrados, no se pudo realizar ya que existe un cierto grado de unión inespecífica de sondas a las proteínas, deducido a partir del marcado de la proteína salvaje que no contiene Cys.

Por otro lado, al haber medido fluorescencia en las muestras que contienen a los mutantes K564C y K690C unidos a fantasmas, afirma nuevamente la independencia de la acilación en la unión HlyA-membranas. El hecho que estos mutantes presentaron baja eficiencia de TE, sugiere la implicancia de los ácidos grasos en el proceso de oligomerización. Para analizar esto, se diseñó el mutante PRO 345, ProHlyA con la mutación K345C. Este mutante presentó menor eficiencia de TE que su análogo de HlyA, sugiriendo la exposición de regiones en HlyA por la presencia de los ácidos grasos que favorecen la interacción proteína-proteína. El ácido graso unido a K690 es de los dos ácidos grasos el mas necesario para la actividad hemolítica, ya que el mutante K690C fue el único que no presentó actividad, ni tampoco oligomerizó en la membrana.

En este contexto se estudió la influencia de los rafts en el proceso de oligomerización. Para esto se utilizaron fantasmas de eritrocitos deplecionados de colesterol por metil β ciclodextrina. El mutante R370C mostró un descenso de TE significativo cuando se estudió la oligomerización con estos fantasmas, sugiriendo la importancia de los rafts en el proceso (Fig.VB.10). Probablemente éstos contribuyan a la concentración de los monómeros y así facilitar la interacción entre ellos.

Luego de demostrar la oligomerización de HlyA en la membrana, se trató sin éxito de aislar esta estructura oligomérica por reacciones de entrecruzamiento y luego

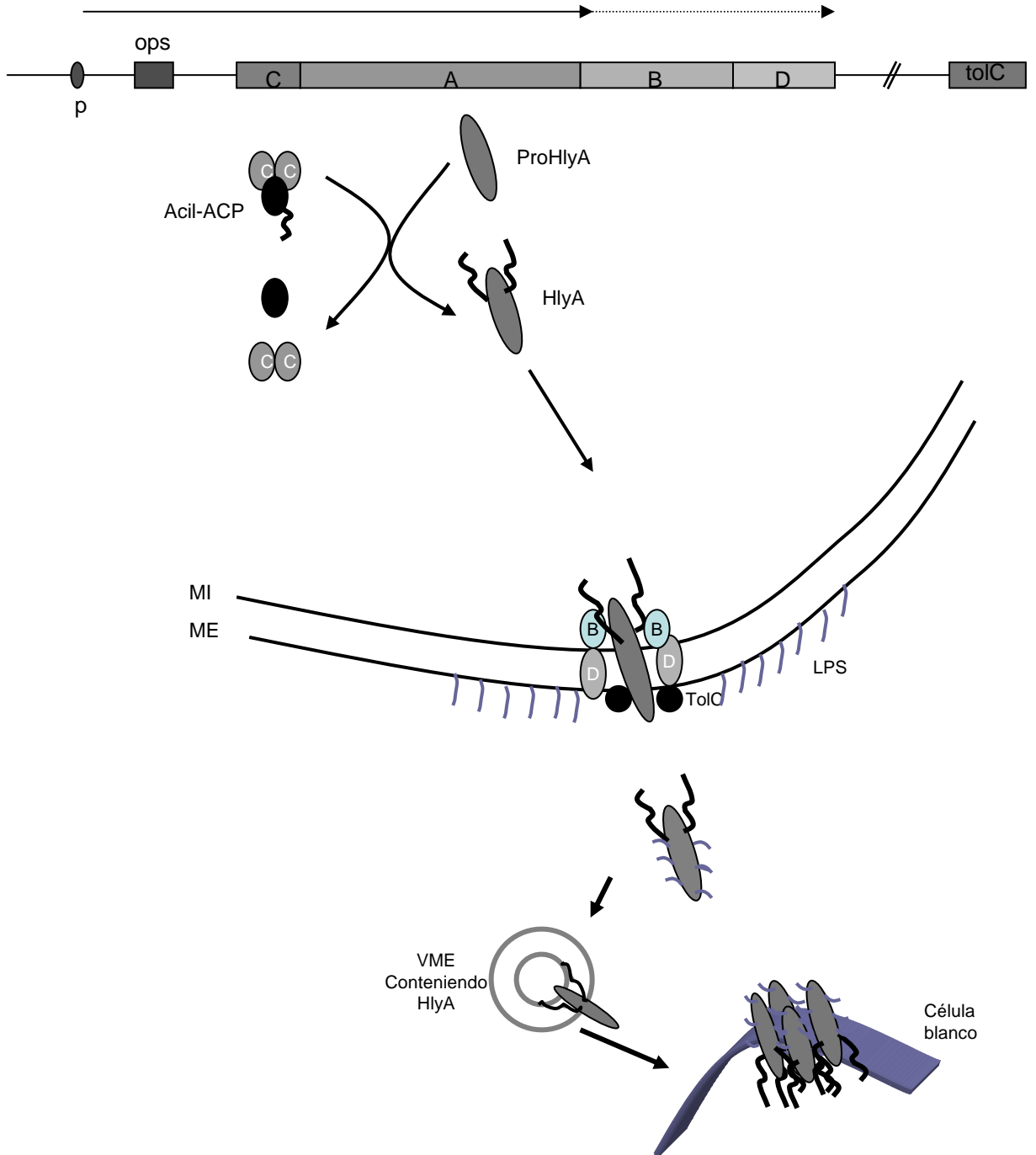
por diferentes técnicas de purificación de proteínas (geles SDS-PAGE, Western Blot, Geles de azarosa, FPLC). El hecho de no haber aislado el oligómero apunta a creer sobre la existencia de un poro dinámico, estructura ya anteriormente propuesta por Bauer and Welch, mediante estudios de protección osmótica de los eritrocitos con azúcares de distinto tamaño (Bauer and Welch, 1996). Ellos mostraron que el tamaño del poro crece en función del tiempo y la concentración de toxina empleada. Como en este caso se trató de aislar el oligómero de los fantasmas de eritrocitos donde se utilizaron relaciones lípido:proteína equivalentes a 80% de unión de HlyA a membranas, correspondiendo a concentraciones líticas, la estructura formada debe contener un número elevado de monómeros que por su unión covalente con el reactivo entrecruzador se forma una estructura tan grande imposible de detectar por las técnicas antes mencionadas. Sumado al factor de la concentración, está el factor tiempo, ya que las reacciones de entrecruzamiento se realizaron durante dos horas (tiempo necesario para que ocurra la unión covalente entre los residuos Lys de las distintas proteínas con el reactivo entrecruzador). El largo tiempo de exposición contribuye a que el tamaño del poro también aumente.

A partir de los resultados encontrados en la tesis surgen nuevos objetivos de trabajos, como el de aislar la estructura que forma HlyA a concentraciones sublíticas en la membrana de los eritrocitos, y si esta estructura permite el ingreso de Ca^{+2} para desencadenar el proceso de eriptosis. Esto sería interesante ya que es sabido que cuando células sensibles de la serie blanca son tratadas con bajas concentraciones de otras toxinas RTX, eventos apoptóticos como fragmentación de ADN ocurren dentro de las 6 hs. Si bien los eritrocitos al estar desprovistos de núcleo y mitocondrias eran consideradas células incapaces de experimentar apoptosis, se ha demostrado recientemente eventos típicos encontrados en la apoptosis de células nucleadas, como disminución de volumen celular, vesiculización de membrana (*blebbing*) y la pérdida de asimetría de la membrana con exposición de fosfatidilserina (PS) por agregado de un ionóforo de calcio ((Lang K.S. et al., 2003),(Lang K.S et al., 2005)). De esta forma, la eriptosis podría ser un mecanismo para que los eritrocitos afectados evadan la hemólisis, como se ha encontrado para el síndrome urémico hemolítico (Lang P.A. et al., 2006).

Otra hipótesis de trabajo que nos planteamos a partir del hallazgo de HlyA en las vesículas de membrana externa es la revisión de algunos ensayos realizados a

concentraciones sublétricas de la proteína utilizando cultivos celulares de macrófagos o linfocitos, ya que las fuentes utilizadas de HlyA en esos experimentos contienen vesículas y su contenido de LPS puede modificar los resultados encontrados acerca de la liberación de mediadores inflamatorios (Czuprynski and Welch, 1995).

Conclusiones

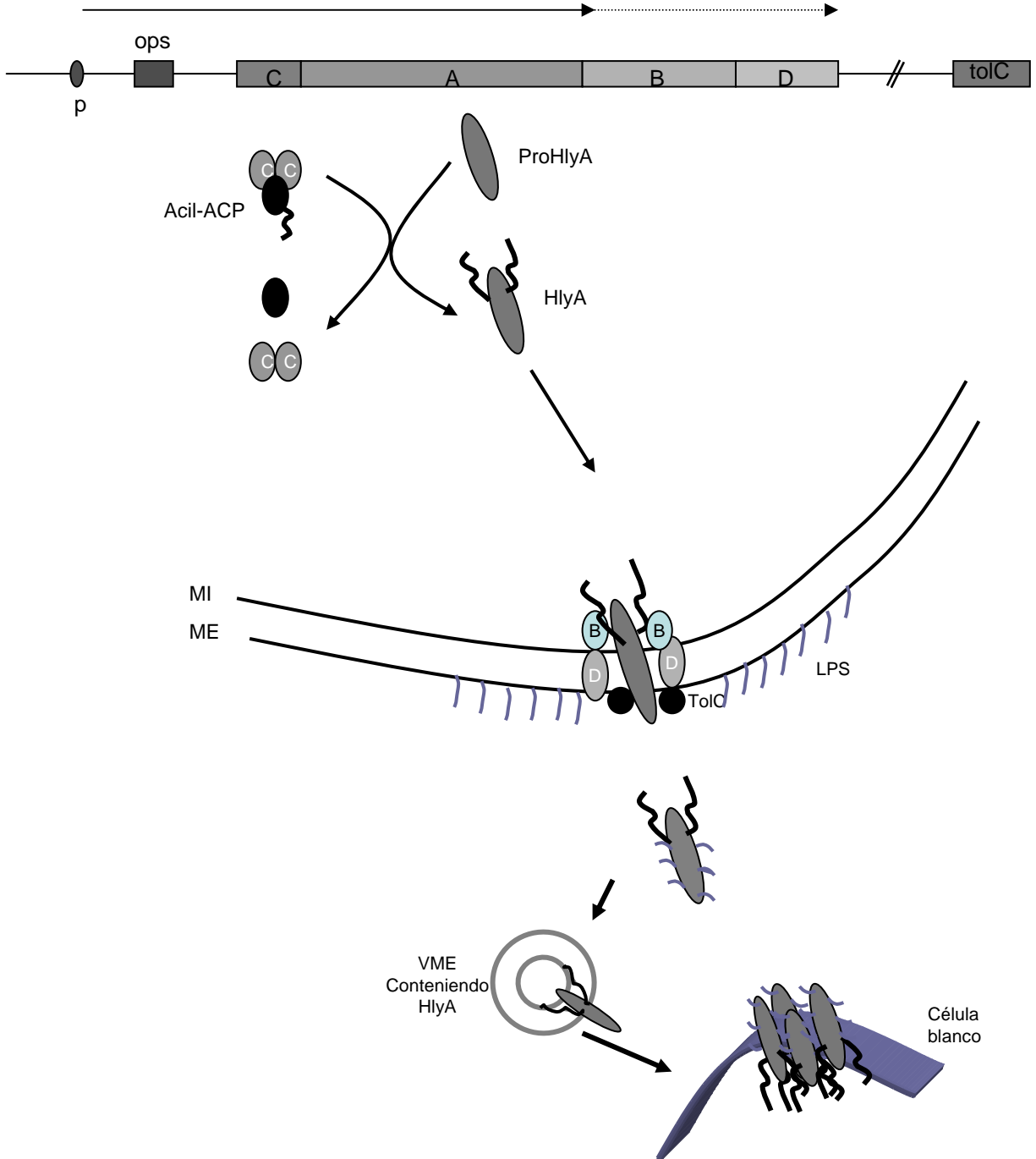


Conclusiones

En síntesis el presente trabajo ha aportado los siguientes conocimientos sobre el mecanismo de acción de HlyA:

- ✓ El complejo HlyA-LPS que se forma al excretarse la toxina al medio extracelular, le otorga estabilidad térmica y química a la proteína. El LPS también actúa indirectamente en su actividad lítica, evitando la agregación irreversible de la toxina y actuando como reservorio de calcio.
- ✓ Se encontró que la toxina activa puede ser excretada al medio asociada a vesículas de membrana externa de bacterias, actuando como un mecanismo alternativo de secreción que produce la concentración de la misma en las vesículas, protegiéndola de la proteólisis sin alterar su mecanismo hemolítico. Estas vesículas transportan moléculas de HlyA concentradas que se transfieren al eritrocito para lisarlo.
- ✓ Los ácidos grasos unidos covalentemente a HlyA inducen un estado glóbulo fundido, parcialmente desnaturizado que expone regiones intrínsecamente desordenadas implicadas en distintos pasos del mecanismo de acción de la toxina, cuando ésta se encuentra en solución.
- ✓ Los ácidos grasos producen un cambio conformacional en la toxina que favorece la unión irreversible de la misma a membranas. Este tipo de unión está implicado en el proceso de oligomerización ya que los ácidos grasos son esenciales para que este proceso ocurra. El proceso de oligomerización está favorecido por la presencia de rafts.

Bibliografía



 Bibliografía

- Akatsuka, H., Binet, R., Kawai, E., Wandersman, C. and Omori, K. (1997). Lipase secretion by bacterial hybrid ATP-binding cassette exporters. Molecular recognition of the LipBCD, PrtDEF and Has DEF exporters. *J. Bacteriol.* 179: 4754-4760.
- Alouf, J. E. (1977). Cell membranes and cytolytic toxins. The specificity and action of animal, bacterial and plant toxins. P. Cuatrecasas. London, Chapman and Hall: 210-270.
- Alouf, J. E. (2000). Bacterial protein toxins: An overview. Humana, Totowa, NJ.
- Alouf, J. E. (2001). Pore-forming bacterial protein toxins: An overview. *Current Top Microbiol Immunol* 257: 1-14.
- Arbuthnott, J. P. (1982). Bacterial cytolisins (membrane damaging toxins). Molecular action of toxins and viruses. L. Cohen, van Heynigen S., New York, Elsevier: 107-109.
- Azami-El-Idrissi, M. E., Bauche, C., Loucka, J., Osicka, R., Sebo, P., Ladant, D. and Leclerc, C. (2003). Interaction of Bordetella pertussis Adenylate Cyclase with CD11b/CD18 : Role of Toxin acylation and identification of the main Integrin interaction domain. *J. Biol. Chem* 278: 38514-38521.
- Backhed, F., Normark, S., Schweda, E., Oscarson, S. and Richter-Dahlfors, A. (2003). Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling : a biological role for LPS modifications. *Microbes Infect* 5: 1057-63.
- Bailey, M., Koronakis, V., Schmoll, T. and Hughes, C. (1992). *Escherichia coli* HlyT protein, a transcriptional activator of haemolysin synthesis and secretion, is encoded by *rfaH* (*srfB*) locus required for expression of sex factor and lipopolisaccharide genes. *Mol Microbiol.* 6: 1003-1012.
- Bailey, R., Dunker, A., Brown, C., Garner, E. and M, G. (2001). Clusterin, a Binding Protein with a Molten Globule-like Region. *Biochemistry* 40: 11818-11840.
- Bakás, L., Chanturiya, A., Herlax, V. and Zimmerberg, J. (2006). Paradoxical lipid dependence of pores formed by *Escherichia coli* α -hemolysin in planar phospholipids bilayer membranes. *Biophys J.* 91:3748-3755.

-
- Bakás, L., Ostolaza, H., Vaz, W. L. and Goñi, F. M. (1996). Reversible adsorption and nonreversible insertion of *Escherichia coli* alpha-hemolysin into lipid bilayers. *Biophys J.* 71: 1869-1876.
- Bakás, L., Veiga, M., Soloaga, A., Ostolaza, H. and Goñi, F. (1998). Calcium-dependent conformation of *E. coli* alpha-haemolysin. Implications for the mechanism of membrane insertion and lysis. *Biochim Biophys Acta* 1368: 225-234.
- Balfanz, J., Rautenberg, P. and Ullmann, U. (1996). Molecular mechanism of action of bacterial exotoxins. *Zbl Bakt* 284: 170-206.
- Balsalobre, C., Silvan, J. M., Berglund, S., Mizunoe, Y., Uhlin, B. E. and Wai, S. N. (2006). Release of the type I secreted alpha-haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 59: 99-112.
- Bauer, M. E. and Welch, R. A. (1996). Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 64: 167-175.
- Bauer, M. E. and Welch, R. A. (1996). Association of RTX toxins with erythrocytes. *Infect Immun* 64: 4665-4672.
- Bauer, M. E. and Welch, R. A. (1997). Pleiotropic effects of a mutation in *rfaC* on *Escherichia coli* hemolysin. *Infect. Immunol.* 65: 218-224.
- Bellalou, J., Sakamoto, H., Ladant, D., Geoffroy, C. and Ullmann, A. (1990). Deletions affecting hemolytic activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Infect Immun* 58: 3242-3247.
- Benz, R., Dobereiner, A., Ludwig, A. and Goebel, W. (1992). Haemolysin of *Escherichia coli*: Comparison of pore-forming properties between chromosome and plasmid-encoded haemolysins. *FEMS Microbiol.Immunol* 105: 55-62.
- Benz, R., Maier, E. and Gentschev, I. (1993). TolC of *Escherichia coli* functions as an outer membrane channel. *Zbl Bakt* 278: 187-196.
- Benz, R., Schmid, A., Wagner, W. and Goebel, W. (1989). Pore formation by the *Escherichia coli* hemolysin: Evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates. *Infection and immunity* 57: 887-895.
- Benz, R., Dobereiner, A., Ludwig, A. and Goebel, W. (1992). Haemolysin of *Escherichia coli*: Comparison of pore-forming properties between chromosome and plasmid-encoded haemolysins. *FEMS Microbiol.Immunol* 105: 55-62.

-
- Bernheimer, A. W. (1970). Cytolytic toxins of bacteria. Microbial. K. Aji S, S, Montie TC. 1.
- Bernheimer, A. W. and Rudy, B. (1986). Interaction between membranes and cytolytic peptides. *Biochem Biophys Acta* 864: 123-141.
- Beveridge, T. J. (1999). Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol* 181: 4725-4733.
- Beveridge, T. J., Makin, S. A., Kadurugamuwa, J. L. and Li, Z. (1997). Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiol Rev* 20: 291-303.
- Bhakdi, S., Mackman, N., Nicaud, J. M. and Holland, I. (1986). *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect. Immun.* 52: 63-69.
- Bhadki, S., Bailey, H., Valava, A., Walev, I., Walker, B., Weller, U., Kehoe, M. and Palmer, M. (1996). Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin: prototype of pore-forming bacterial cytolisins. *Arch. Microbiol.* 165: 73-79.
- Bhakdi, S. and Martin, E. (1991). Superoxide generation by human neutrophils induced by low doses of *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun* 59: 2955-2962.
- Bhakdi, S., Muhly, M., Korom, S. and Schmidt, G. (1990). Effects of *Escherichia coli* hemolysin on human monocytes. Cytocidal action and stimulation of interleukin I release. *J. Clin. Invest* 85: 1746-1753.
- Bohach, G. A. and Snyder, I. S. (1985). Chemical and immunological analysis of the complex structure of *Escherichia coli* hemolysin. *J. Bacteriol.* 164: 1071-1080.
- Bohach, G. A. and Snyder, I. (1986). Composition of affinity-purified α -hemolysin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 53: 435-437.
- Boehm, D., Welch, R. and Snyder, I. (1990). Domains of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) involved in binding of calcium and erythrocyte membranes. *Infect Immunity* 58: 1959-1964.
- Brandenburg, K., Andra, J., Muller, M., Koch, M. and Garidel, P. (2003). Physicochemical properties of bacterial glycopolymers in relation to bioactivity. *Carbohydr Res* 338: 2477-89.
- Brandenburg, K., Mayer, H. and Koch, M. (1993). Influence of the supramolecular structure of free lipid A on its biological activity. *Eur J Biochem* 218: 555-63.

-
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72,: 248-254.
- Cardamone and Puri, N. B. J., 589-593. (1992). Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins. *Biochem J.* 282: 589-593
- Cavaliere, S., Bohach, G. A. and Synder, I. (1984). *Escherichia coli* α -hemolysin characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol. Rev* 48: 326-343.
- Chen, P., T. Toribara, et al. (1956). Microdetermination of phosphorus. *Anal Chem* 28: 1756-1758.
- Chevaux, C. and Holland, I. (1996). Random and directed mutagenesis to elucidate the functional importance of helix II and F-989 in the C-terminal secretion signal of *Escherichia coli* hemolysin. *J. Bacteriol.* 178: 1232-1236.
- Coote, J. G. (1992). Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol.Rev* 88: 137-162.
- Coote, J. G. (1996). The RTX toxins of Gram-negative bacterial pathogens:modulators of the host immune system. *Rev.Med.Microbiol* 7: 53-62.
- Cortajarena, A., Goñi, F. and Ostolaza, H. (2001). Glycophorin as a receptor for *Escherichia coli* α -hemolysin in erythrocytes. *J. Biol. Chem* 276: 12513-12519.
- Cortajarena, A. L., Goñi, F. M. and Ostolaza, H. (2003). A receptor- binding region in *Escherichia coli* α -haemolysin. *J.Biol.Chem.* 278: 19159-19163.
- Creighton, T. E. (1984). *Proteins, Structures and Molecular Properties*, 1st ed., W. H. Freeman and Co., New York.
- Cruz, W., Young, R., Chang, Y. F. and Struck, D. (1990). Deletion analysis resolves cell binding and lytic domains of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect Immun* 59: 3126-3133.
- Czuprynski, C. J. and Welch, R. A. (1995). Biological effects of RTX toxins: the possible role of lipopolysaccharide. *Trends Microbiol.* 12: 480-483.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A. and Colombel, J. F. (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115: 1405-1413.
- De Maagd, R. A., Wijffjes, A. H., Spaink, H. P., Ruiz-Sainz, J. E., Wijffelman, C. A., Okker, R. J. and Lugtenberg, B. J. (1989). *nodO*, a new *nod* gene of the

- Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* Sym plasmid pRLJI, encodes a secreted protein. J. Bacteriol. 171: 6764-6770.
- Devoe, I. W. and Gilchrist, J. E. (1973). Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitidis*. J Exp Med 138: 1156-1167.
- Dietrich, G., Viret, J. F. and Gentschev, I. (2003). Haemolysin A and listeriolysin-two vaccine delivery tools for the induction of cell-mediated immunity. International Journal for Parasitology 33: 495-505.
- Dinh, T., Paulsen, I. T. and Saier, M. H. J. (1994). A family of extracytoplasmatic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 176: 3825-3831.
- Dunker, K., Lawson, J. D., Brown, R., Williams, P. and Romero, J. (2001). Intrinsically disordered protein. J. Mol. Graph. Model 19: 26-59.
- Dunker, A. K., Cortese, M. S., Romero, P., Iakoucheva, L. M. and Uversky, V. N. (2005). Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. FEBS J. 20: 5129-48.
- Elliott, S. J., Srinivas, S., Albert, M. J., Khorshed, A., Robins-Browne, R., Gunzburg, S. T., Mee, B. M. and Chang, B. J. (1998). Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic *Escherichia coli* linked to human diarrhea. Infection and immunity 66: 2040-2051.
- Erb, K., Vogel, M., Wagner, W. and Goebel, W. (1987). Alkaline phosphatase which lacks its own signal sequence becomes enzymatically active when fused to N-terminal sequences of *Escherichia coli* α -hemolysin(HlyA). Mol.Gen.Genet 208: 88-93.
- Felmlee, T., Pellet, S. and Welch, R. (1985). Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. J. Bacteriol. 163: 94-105.
- Fiocca, R., Necchi, V., Sommi, P., Ricci, V., Telford, J., Cover, T. L. and Solcia, E. (1999). Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. J Pathol 188: 220-226.
- Folch, J., Lees, M., Sloan, E. and Standley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem 226: 497-509.

-
- Fomsgaard, A., Freudenberg, M. and Galanos, C. (1990). Modification of the silver staining technique to detect lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 28: 2627-2631.
- Forestier, C. and Welch, R. (1991). Identification of RTX toxin target cell specificity domains by use of hybrid genes. *Infect Immun* 59: 4212-220.
- Fung, B. K. and L. Stryer (1978). "Surface density determination in membranes by fluorescence energy transfer." *Biochemistry* 17: 5241-5248.
- Gangola, P. and Rosen, B. (1987). Maintenance of intracellular calcium in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262: 12570-12574.
- Gentschev, I., Mollenkopf, H., Sokolovic, Z., Hess, J., Kaufmann, S. H. E. and Goebel, W. (1996). Development of antigen-delivery systems, based on the *Escherichia coli* haemolysin secretion pathway. *Genes* 179: 133-140.
- Gentschev, I., Dietrich, G. and Goebel, W. (2002). The *E. coli* α -hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol.* 10: 39-45.
- Gentschev, I. and Goebel, W. (1992). Topological and functional studies on HlyB of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 232: 40-48.
- Gonzalez Carrero, M. I., Zabala, J. C., De la Cruz, F. and Ortiz, J. M. (1985). Purification of alpha-hemolysin from an overproducing *E. coli* strain. *Mol Gen Genet.* 199: 106-110.
- Grimminger, F., Rose, F., Sibelius, U., Meinhardt, M., Potzsch, B., Spriestersbach, R., Bhakdi, S., Suttorp, N. and W., S. (1997). Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins *Escherichia coli* hemolysin and staphylococcal -toxin. *J. Immunol.* 159: 1909-1916.
- Grimminger, F., Sibelius, U., BHadki, S., Suttorp, N. and Seeger, W. (1991). *Escherichia coli* hemolysin is a potent inducer of phosphoinositide hydrolysis and related metabolic responses in human neutrophils. *J. Clin. Invest* 88: 1531-1539.
- Hardie, K., Issartel, J., Koronakis, E., Hughes, C. and Koronakis, V. (1991). *In vitro* activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature membrane-targeted toxin requires HlyC and low molecular-weight cytosolic polypeptide. *Mol. Microbiol* 5: 1669-1679.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988). Antibodies, Cold Spring Harbord Laboratory.

-
- Hess, J., Wels, W., Vogel, M. and Goebel, W. (1986). Nucleotide sequence of a plasmid-encoded hemolysin determinant and its comparison with a corresponding chromosomal hemolysin sequence. *FEMS Microbiol.Lett.* 34: 1-11.
- Holland, I., B. and Bligh, M. A. (1999). ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J.Mol.Biol* 293: 381-399.
- Horstman, A. L. and Kuehn, M. J. (2000). Enterotoxigenic *E.coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J Biol Chem* 275: 12489-12496.
- Hozbor, D., Rodriguez, M. E., Fernandez, J., Lagares, A., Guiso, N. and Yantorno, O. (1999). Release of outer membrane vesicles from *Bordetella pertussis*. *Curr Microb* 38: 273-278.
- Hughes, C., Hacker, J., Roberts, A. and Goebel, W. (1983). Haemolysin production as a virulence marker in symptomatic an asymptomatic urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Infect Immun* 39: 546-551.
- Hughes, C., Issartel, J., Hardie, K., Standley, P., Koronakis, E. and Koronakis, V. (1992). Activation of *Escherichia coli* prohemolysin to the membrane-targetted by HlyC-directed ACP-dependent fatty acylation. *FEMS Microbiol.Immunol* 105: 37-44.
- Hui, D., Morden, C., Zhang, F. and Ling, V. (2000). Combinatorial analysis of the structural requirements of the *Escherichia coli* hemolysin signal sequence. *J.Biol.Chem.* 275: 2713-2720.
- Hyland, C., Vuillard, L., Hughes, C. and Koronakis, V. (2001). Membrane interaction of *Escherichia coli* Hemolysin: Flotation and Insertion-Dependent Labeling by Phospholipid Vesicles. *J. Bacteriol* 183: 5364-5370.
- Issartel, J., Koronakis, V. and Hughes, C. (1991). Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation. *Nature* 351: 759-761.
- Jarchau, T., Chakraborty, T., Garcia, F. and Goebel, W. (1994). Selection for transport competence of C-terminal polypeptides derived from *Escherichia coli* hemolysin: the shortest peptide capable of autonomous HlyB/HlyD-dependent secretion comprises the C-terminal 62 amino acids of HlyA. *Mol Gen Genet* 245: 53-60.

-
- Jonas, D., Schultheis, B., Klas, C., Krammer, P. and Bhadki, S. (1993). Cytocidal effects of *Escherichia coli* hemolysin on human T lymphocytes. *Infect Immun* 61: 1715-1721.
- Kadurugamuwa, J. L. and Beveridge, T. J. (1995). Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J. Bacteriol* 177: 3998-4008.
- Kadurugamuwa, J. L. and Beveridge, T. J. (1997). Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release. *J. Antimicrob. Chemother* 40: 615-621.
- Kaneko, J. and Kamio, Y. (2004). Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 981-1003.
- Karkhanis, A. D., J.Y, Z., J., J. and D.J., C. (1978). A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolisaccharide of Gram-negative bacteria. *Anal. Biochem.* 85: 595-601.
- Kato, S., Kowashi, Y. and Demuth, D. R. (2002). Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microb Pathog* 32: 1-13.
- Keenan, J., Day, T., Neal, S., Cook, B., Perez-Perez, G., Allardyce, R. and Bagshaw, P. (2000). A role for the bacterial outer membrane in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *FEMS Microbiol Lett* 182: 259-264.
- Keil, B. (1992). Specificity of proteolysis. New York.
- Koning, B., Ludwig, A., Goebel, W. and Koning, W. (1994). Pore formation by the *Escherichia coli* alpha-hemolysin: role mediator release from human inflammatory cells. *Infect Immun* 62: 4611-4617.
- Koronakis, V., Cross, M. and Hughes, C. (1988). Expression of the *E. coli* hemolysin secretion gene *hlyB* involves transcript antitermination within the *hly* operon. *Nucleic Acids Res* 16: 4789-4799.
- Koronakis, V., Hughes, C. and Koronakis, E. (1991). Energetically distinct early and late stages of HlyB/HlyD-dependent secretion across both *Escherichia coli* membranes. *EMBO J.* 10: 3263-3272.

-
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. and Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405: 914-919.
- Korornakis, E., Hughes, C., Milisav, I. and Koronakis, V. (1995). Protein exporter function and *in vivo* ATPase activity are correleted in ABC-domain mutants of HlyB. *Mol.Microbiol* 16: 87-96.
- Kriwacki, R. W., Wu, J., Tennant, L., Wright, P. E. and Siuzdak, G. (1997). Probing protein strucutre using biochemical and biophysical methods. Proteolysis matrix-assisted laser desortion/ionization mass spectrometry; high-performance liquid chromatography and size exclusion chromatography of p21Waf1/lip1/sali J. *Chromatogr.A* 777: 23-30.
- Kuehn, M. J. and Kesty, N. C. (2005). Bacterial outer membrane vesicles and host-pathogen interaction. *Genes and Development* 19: 2645-2655.
- Kuzmin, P., Zimmerberg, J., Chizmadzhev, Y. and Cohen, F. (2000). A quantitative model for membrane fusion based on low-energy intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 7235-7240.
- Lackowicz, J. (1984). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press New York N.Y: 357-359.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assenbly of the head of bacteriophageT4. *Nature* 227: 680-685.
- Lally, E. T., Hill, R., Kieba, I. and Korostoff, J. (1999). The interaccion between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol.* 7: 356-361.
- Lally, E. T., Kieba, I. R., Sato, A., Green, C. L., Rosenbloom, J., Korostoff, J., Wang, J. F., Shenker, B. J., Ortlepp, S., Robinson, M. K. and Billings, P. C. (1997). RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells. *J Biol Chem.* 272: 30463-9.
- Lang K.S, Lang P.A, Bauer C., Duranton C., Wieder T., Huber S.M. and F., L. (2005). Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 15: 195-202.Review.
- Lang K.S., Duranton C., Poehlmann H., Myssina S., Bauer C., Lang F., Wieder T. and S.M., H. (2003). Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ* 10: 249-56.
- Lang P.A., Beringer O., Nicolay J.P., Amon O., Kempe D.S., Hermle T., Attanasio P., Akel A., Schafer R., Friedrich B., Risler T., Baur M., Olbricht C.J.,

- Zimmerhackl L.B., Zipfel P.F., Wieder T. and F., L. (2006). Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome. *J Mol Med* 84: 378-88.
- Lebek, G. and Gruening, H. (1985). Relation between the hemolytic property and iron metabolism in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 50:682-686
- Lentz, B. and Lee, J. K. (1999). Poly(ethylenglycol)(PEG)-mediated fusion between pure lipid bilayers: a mechanism in common with viral fusion and secretory vesicles release? *Mol. Memb.Biol.* 16: 279-296.
- Létoffé, S., Delepelaire, P. and Wandersman, C. (1990). Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*: the specific secretion functions are analogous to those of *Escherichia coli* α -hemolysin. *EMBO J.* 9: 1375-1382.
- Li, J. and Clinkenbeard, K. (1999). Lipopolysaccharide complexes with *Pasteurella haemolytica* leucotoxin. *Infect Immunol.* 67: 2920-2927.
- Ligi, F., Ciacci, C., Palma, F. and Palma, F. (1988). Comparative study of the cytoplasmic domain of band 3 from human and rabbit erythrocyte membranes. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 121: 265-271.
- Lin, W., Fullner, K., Clayton, R., Sexton, J., Rogers, M., Calia, K., Calderwood, S., Fraser, C. and Mekalanos, J. (1999). Identification of a *Vibrio cholera* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proc. Natl Acad Sci USA* 96: 1071-1076.
- Long-sen, C., Her-ya, W., Jen-Jung, H. and Chung-Chang, C. (1994). Energy transfer from tryptophan residues of proteins to 8-Anilino-naphthalene-1-sulfonate. *J. Protein Chem* 13: 635-640.
- Ludwig, A., Benz, R. and Goebel, W. (1993). Oligomerization of *Escherichia coli* haemolysin (Hly) is involved in pore formation. *Mol. Gen. Genet* 241: 89-96.
- Ludwig, A., García, F., Bauer, S., Jarchau, T., Benz, R., Hoppe, J. and Goebel, W. (1996). Analysis of the in vivo activation of hemolysin from *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 178: 5422-5430.
- Ludwig, A., Jarchau, T., Benz, R. and Goebel, W. (1988). The repeat domain of *Escherichia coli* haemolysin (HlyA) is responsible for its Ca²⁺-dependent binding to erythrocytes. *Mol Gen Genet.* 214: 553-561.
- Ludwig, A., Schmid, A., Benz, R. and Goebel, W. (1991). Mutations affecting pore formation by haemolysin from *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 226: 198-208.

-
- Ludwig, A., Vogel, M. and Goebel, W. (1987). Mutations affecting activity and transport of haemolysin in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 206: 238-254.
- Maity, H. and Kasturi, S. 1998, Interaction of bis(1-anilino-8-naphthalenesulfonate) with yeast hexokinase: a steady-state fluorescence study. *J Photochem . Photobiol* 47: 190-196.
- Maniatis, T., Fritsch, E. and Sambrook, J. (1989). Molecular cloning. New York., Cold Spring Harbor laboratory Press.
- Melkonian, K. A., Ostermeyer, A., Chen, J., Roth, M. and Brown, D. (1999). Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem.* 274: 3910-3917.
- Menestrina, G. (1988). *Escherichia coli* hemolysin permeabilizes small unilamellar vesicles loaded with calcein by a single-hit mechanism. *FEBS Lett.* 232: 217-220.
- Menestrina, G., Mackman, N., Holland, I., B. and Bhadki, S. (1987). *Escherichia coli* haemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes. *Biochem Biophys Acta* 905: 109-117.
- Menestrina, G., Pederzoli, C., Dalla Serra, M., Bregante, M. and Gambale, F. (1996). Permeability increase induced by *Escherichia coli* hemolysin A in human macrophages is due to the formation of ionic pore: a patch clamp characterization. *J.Membrane Biol.* 149: 113-121.
- Menestrina, G., Ropele, M., Dalla Serra, M., Pederzoli, C., Ferdinand, H., Pellet, S. and Welch, R. (1995). Binding of antibodies to functional epitopes on the pore formed by *Escherichia coli* hemolysin in cells and model membranes. *Biochimica et biophysica Acta* 1238: 72-80.
- Moayeri, M. and Welch, R. (1994). Effects of temperature, time, and toxin concentration on lesion formation by the *Escherichia coli* hemolysin. *Infection and immunity* 62: 4124-4134.
- Moayeri, M. and Welch, R. (1997). Prelytic and lytic Conformation of erythrocyte-associated *Escherichia coli* hemolysin. *Infection and immunity* 65: 2233-2239.
- Mouriño, M., Muñoa, F., Balsalobre, C., Diaz, P., Madrid, C. and Juarez, A. (1994). Environmental regulation of a-hemolysin expression in *Escherichia coli*. *Microbiol. Pathog* 16: 249-259.

-
- Muller, D., Hughes, C. and Goebel, W. (1983). Relationship between plasmid and chromosomal hemolysin determinants of *Escherichia coli*. J .Bacteriol. 153: 846-851.
- Myers, J., Pace, C. and Scholtz, J. (1995). Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. Protein Sci. 4: 2138-2148.
- Nieto, J., Hughes, C., Bailey, M. and Koronakis, V. (1996). Suppression of transcription polarity in the *E.coli* hemolysin operon by a short upstream element shared by polysaccharide and DNA transfer determinants. Mol.Microbiol 19: 705-714.
- Oakley, B. R., Kirsch, D. R. and Morris, N. R. (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal Biochem. 105: 361-363.
- Oropeza-Wekerle, R., Muller, S., Briand, J., Benz, R., Schmid, A. and Goebel, W. (1992). Haemolysin-derived synthetic peptides with pore-forming and haemolytic activity. Mol.Microbiol 6: 115-121.
- Ostolaza, H., Bakas, L. and Goñi, F. (1997). Balance of electrostatic and hydrophobic interactions in the lysis of model membranes by *E. coli* alpha-haemolysin. J Membr Biol. 158: 137-145.
- Ostolaza, H., Bartolome, B., Ortiz de Zarate, I., De la Cruz, F. and Goñi, F. M. (1991). Alpha -haemolysin from *E.coli*, Purification and self aggregation properties. FEBS Lett. 280: 195-198.
- Ostolaza, H., Bartolome, B., Ortiz de Zarate, I., de la Cruz, F. and Goñi, F. M. (1993). Release of lipid vesicle contents by the bacterial protein toxin alpha-haemolysin. Biochim Biophys Acta 1147: 81-88.
- Ostolaza, H. and Goñi, F. M. (1995). Interaction of the bacterial protein toxin alpha-haemolysin with model membranes: protein binding does not always lead to lytic activity. FEBS Lett. 371: 303-306.
- Ostolaza, H., Soloaga, A. and Goñi, F. M. (1995). The binding of divalent cations to *Escherichia coli* alpha-haemolysin. Eur J Biochem 228: 39-44.
- Pellett, S., Boehm, D., Snyder, I., Rowe, G. and Welch, R. (1990). Characterization of monoclonal antibodies against the *Escherichia coli* hemolysin. Infection and immunity 58: 822-827.
- Perez, M., Fried, B. and Sherma, J. (1994). Comparison of mobile phases and HPTLC qualitative and quantitative analysis, on preadsorbent silica gel plates, of

-
- phospholipids in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) infected with *Echistoma caproni* (Trematoda). *Journal of Planar Chromatography* 7: 340-343.
- Peters, C., Bayer, M. J., Buhler, S., Andersen, J. S., Mann, M. and Mayer, A. (2001). Trans-complex formation by proteolipid channel in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* 409: 581-588.
- Rennie, R. P. and Arbuthnott, J. P. (1974). Partial characterization of *Escherichia coli* Haemolysin. *J Med Microbiol* 7: 179-88.
- Ropele, M. and Menestrina, G. (1989). Electrical properties and molecular architecture of the channel formed by *Escherichia coli* hemolysin in planar lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 985: 9-18.
- Rowe, G., Pellet, S. and Welch, R. (1994). Analysis of toxinogenic functions associated with the RTX repeat region and monoclonal antibody D12 epitope of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA). *Infect. Immun.* 62: 579-588.
- Rowe, G. E. and Welch, R. (1994). Assay of hemolytic toxins. *Meths Enzymol* 235: 657-667.
- Sambrook, J. and W. Russell (2001). Molecular Cloning a laboratory Manual. New York.
- Sanchez-Magraner, L., Cortajarena, A., Goni, F. and Ostolaza, H. (2006). Membrane insertion of *Escherichia coli* alpha-hemolysin is independent from membrane lysis. *J. Biol. Chem* 281: 5461-5467.
- Sandri, M., Rizzi, C., Catani, C. and Carraro, U. (1993). Selective removal of free dodecyl sulfate from 2-mercaptoethanol-SDS-solubilized proteins before KDS. *Anal Biochem.* 213: 34-39.
- Saurin, W., Hofnung, M. and Dassa, E. (1999). Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J.Mol.Evol.* 48: 22-41.
- Schindel, C., Zitzer, A., Schulte, B., Gerhards, A., Stanley, P., Hughes, C., Koronakis, V., Bhadki, S. and Palmer, M. (2001). Interaction of *Escherichia coli* hemolysin with biological membranes: A study using cysteine scanning mutagenesis. *Eur J Biochem* 268: 800-808.
- Schnaitman, C. A. and Klena, J. D. (1993). Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev* 57: 655-682.

-
- Schromm, A., Brandenburg, K. and Loppnow, H. (2000). Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur J Biochem* 267: 2008-13.
- Schulein, R., Gentschev, I., Mollenkopf, H. and Goebel, W. (1992). A topological model for the haemolysin translocator protein HlyD. *Mol Gen Genet.* 234: 155-163.
- Seeger, W., Walter, H., Suttorp, N., Muhly, M. and Bhadki, S. (1989). Thromboxane-mediated hypertension and vascular leakage evoked by low doses of *Escherichia coli* alpha-hemolysin in rabbit lungs. *J.Clin. Invest* 84: 220-227.
- Shauds, J. and Chun, P. (1980). The dispersion of gram negative lipopolisaccharide by deoxycolate. *J. Biol. Chem* 255: 121-126.
- Snyder, I. S. and Zwadyk, P. (1969). Some factors affecting production and assay of *Escherichia coli* hemolysin. *J.Gen. Microbiol.* 5: 133-143
- Soloaga, A., Veiga, P., García Segura, L., Ostolaza, H., Brasseur, R. and F, G. (1999). Insertion of *Escherichia coli* α -haemolysin in lipid bilayer as a non-transmembrane integral protein:prediction and experiment. *Molecular Microbiology* 31: 1013-1024.
- Soloaga, A., Ostolaza, H., Goñi, F. and De la Cruz, F. (1996). Purification of *Escherichia coli* pro-haemolysin, and a comparison with the properties of mature α -haemolysin. *Eur. J. Biochem.* 238: 418-422.
- Soloaga, A., Ramirez, J. M. and Goñi, F. M. (1998). Reversible denaturation, self aggregation and membrane activity of *Escherichia coli* α -Hemolysin, a protein stable in 6 M Urea. *Biochemistry* 37: 6387-6393.
- Song, L., Hobaugh, M. R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H. and Gouaux, J. E. (1996). Structure of Staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 274: 1859-1866.
- Spreng, S., Dietrich, G., Goebel, W. and Gentschev, I. (1999). The *Escherichia coli* haemolysin secretion apparatus: a potencial universal antigen delivery system in gram-negative bacterial vaccine carriers. *Mol.Microbiol* 31: 1596-1598.
- Standley, P., Diaz, P., Bailey, M., Gygy, D., Juarez, A. and Hughes, C. (1993). Loss of activity in the secreted form of *Escherichia coli*. Haemolysin caused by and rfaP lesion in core lipopolysaccharide assembly . *Mol Microbiol.* 10: 781-787.

-
- Standley, P., Koronakis, V., Hardie, K. and Hughes, C. (1996). Mutational analysis supports a role for a multiple structural feature in the C-terminal signal of *Escherichia coli* hemolysin. *Mol. Microbiol* 20: 813-822.
- Standley, P., Packman, L., Koronakis, V. and Hughes, C. (1994). Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of *Escherichia coli* hemolysin. *Science* 266: 1992-1996.
- Stanley, P., Koronakis, V. and Hughes, C. (1998). Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: A unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 309-333.
- Struck, D. K., Hoekstra, D. and Pagano, R. E. (1981). Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry*. 20: 4093-4099.
- Surewickz, W. K. and R. M. Epand (1984). Role of peptide structure in lipid-peptide interactions: A fluorescence study of a binding of pentagastrin-related pentapeptides to phospholipid vesicles. *Biochemistry* 23: 6072-6077.
- Suttorp, N., Floer, B., Schnittler, H., Seeger, W. and Bhadki, S. (1990). Effects of *Escherichia coli* hemolysin on endothelial cell function. *Infect Immun* 58: 3796-3801.
- Thanabalu, T., Koronakis, E., Hughes, C. and Koronakis, V. (1998). Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E. coli* : reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *The EMBO Journal* 17: 6487-6496.
- Vaara, M. and Nikaido, H. (1984). Outer membrane organization. Handbook of Endotoxin. F. T. Rictschel. Amsterdam, Elsevier. **1**: 1-45.
- Valeva, A., Walev, I., Kemmer, H., Weis, S., Siegel, I., Boukhallouk, F., Wassenaar, T., Chavakis, T. and Bhakdi, S. (2005). Binding of *Escherichia coli* Hemolysin and Activation of the Target Cells is Not Receptor-dependent. *J Biol Chem* 280: 36657-36663.
- Valeva, A., Hellmann, N., Walev, I., Strand, D., Plate, M., Boukhallouk, F., Hanada, K., Decker, H. and Bhakdi, S. (2006). Evidence that clustered phosphocholine head groups serve as sites for binding and assembly of an oligomeric protein pore. *J. Biol Chem*. 281:26014-21.
- Vazquez, M. J., Rivas, M. G. and Gennaro, A. M. (2002). Manipulación del contenido de colesterol en membranas de glóbulos rojos humanos (GRH) mediante

-
- metil- β -ciclodextrina (M β CD): Evolución temporal y cambios en la forma celular. *Revistas FABICIB* 6: 121-127.
- Wai, S. N., Lindmark, B., Soderblom, T., Takade, A., Westermark, M., Oscarsson, J., Jass, J., Richter-Dahlfors, A., Mizunoe, Y. and Uhlin, B. E. (2003). Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell* 115: 25-35.
- Wai, S. N., Takade, A. and Amako, K. (1995). The release of outer membrane vesicles from the strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol* 39: 451-456.
- Waley, I., Vollmer, P., Palmer, M., Bhadki, S. and Rosejohn, S. (1996). Pore-forming toxins trigger shedding of receptors for interleukin-6 and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 7882-7887.
- Wandersman, C. and Delepelaire, P. (1990). TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 4776-4780.
- Wandersman, C. and Letouffe, S. (1993). Involvement of lipopolysaccharide in the secretion of *Escherichia coli* α -hemolysin and *Erwinia chrysantemi* proteases. *Mol Microbiol* . 7: 141-150.
- Wang, R., Seror, S., Blight, M., Pratt, J., Broome-Smith, J. and Holland, I. (1991). Analysis of the membrane organization of an *Escherichia coli* protein translocator HlyB, a member of a large family of prokaryote and eukaryote surface transport proteins. *J.Mol.Biol* 217: 441-454.
- Welch, R. (2001). RTX Toxin Structure and Function: A Story of Numerous Anomalies and Few Analogies in Toxin Biology. *Current Top Microbiol Immunol* 257: 85-111.
- Welch, R., Dellinger, E., Minshew, B. and Falkow, S. (1981). Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E.coli* infections. *Nature* 294: 665-667.
- Welch, R. A. (1991). Pore-forming cytolisins of Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol* 5: 521-528.
- Westphal, Q. and Jann, K. (1965). Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure,. *Methods Carbohydr. Chem* 5: 83-89.

-
- Worsham, L. M., Langston, K. G. and Ernst-Fonberg, M. L. (2005). Thermodynamics of a protein acylation: activation of *Escherichia coli* hemolysin toxin. *Biochemistry* 44: 1329-1337.
- Yang, W.S., Park, S. O., Yoon, A. R., Yoo, J. Y., Kim, M. K., Yun, C. O. and Kim, C. M. (2006). Suicide cancer gene therapy using pore-forming toxin, streptolysin O. *Mol. Cancer Ther.* 5: 1610-1619.
- Young, J. and Holland, I., B. (1999). ABC transporters: bacterial exporters revisited five years on. *Biochem Biophys Acta Biomembr* 1461: 177-200.
- Zhang, F., Greig, D. I. and Ling, V. (1993). Functional replacement of the hemolysin A transport signal by a different primary sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 4211-4215.